



Contribution du foie et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse humorale à Immunoglobines A

Ludovic Moro-Sibilot

► To cite this version:

Ludovic Moro-Sibilot. Contribution du foie et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse humorale à Immunoglobines A. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10207 . tel-01233261

HAL Id: tel-01233261

<https://theses.hal.science/tel-01233261>

Submitted on 24 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE d'IMMUNOLOGIE

présentée devant
l'Université Claude BERNARD – Lyon 1

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Inserm U1111 – CNRS UMR5308 – ENS Lyon – Université Lyon 1



Centre
International
de Recherche
en Infectiologie

Soutenue publiquement le 5 novembre 2015 par

M. Ludovic MORO-SIBILOT

CONTRIBUTION DU FOIE ET DES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES DANS LA REPONSE HUMORALE À IMMUNOGLOBULINES A

Sous la direction de Dr Dominique KAISERLIAN et Dr Bertrand DUBOIS.

JURY

Pr Renato MONTEIRO	<i>Rapporteur</i>
Dr Dominique BUZONI-GATEL	<i>Rapporteur</i>
Pr Mathias FAURE	<i>Président du jury</i>
Dr Stéphane PAUL	<i>Examineur</i>
Dr Dominique KAISERLIAN	<i>Directeur de thèse</i>
Dr Bertrand DUBOIS	<i>Directeur de thèse</i>

à Charly & Rita,

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Dr Dominique Buzoni-Gatel et Pr Renato Monteiro de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de mon manuscrit. Merci également à Pr Mathias Faure d'avoir accepté de prendre la présidence du jury, et pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse, notamment concernant mon activité complémentaire d'enseignement.

Dominique, merci à toi de m'avoir permis de vivre cette expérience extraordinaire ! J'ai vécu les quatre années (fortes en émotions !) les plus riches de ma vie, en partie grâce à ton soutien constant. Car même si nous n'avons pas été d'accord sur tous les points de vue, voire même pas du tout d'accord, nos « engueulades » se sont toujours résolues sur des points positifs ! Merci également de m'avoir permis de vivre en ta compagnie ces différents congrès internationaux, durant lesquels tu m'as fait rencontrer les grandes « stars » du domaine. Ces moments resteront gravés dans ma mémoire.

Bertrand, merci pour tout... Merci d'abord de m'avoir choisi et de m'avoir fait confiance. Merci pour ton enseignement, ta rigueur, tes conseils et ton soutien du premier au dernier jour de ma thèse. Tu as été un véritable guide et un modèle pour moi, ce qui m'a d'ailleurs valu d'être régulièrement appelé « Bertrand » par Dominique, involontairement ! C'est bon signe donc ! Je pense que tu m'as permis de confirmer la passion que j'ai pour ce métier, que j'espère pouvoir continuer à exercer dans le futur... Alors encore une fois, merci pour tout.

J'adresse un merci tout particulier à Thierry Defrance, Laurent Genestier, Morgan Taillardet, Olivier Thaumat et Pascal Blanc pour avoir toujours été disponibles pour discuter (de science et d'autres choses !), partager avec moi leur savoir dans le domaine du lymphocyte B, et me donner des conseils toujours pertinents. Les gars, votre aide fut très précieuse !

Merci également à tous les gens qui ont participé directement ou indirectement à la réalisation de mon projet de thèse, en particulier les membres actuels et passés de l'équipe de Dominique : Emilie, Claire, Gilles, Rémi, Stéphane, Alain... Merci aussi à Nathalie Isorce, Julie Lucifora et Alexandra Traverse-Glehen pour leur participation dans l'étude du foie humain ; et à mes compères thésards et autres : Rémy, Emilie, Antoine, Chien-Chia, Alice, Dimitri, Manu... Merci aussi à Stéphane et Eve-Isabelle de m'avoir accompagné durant cette thèse, vos conseils et votre soutien ont toujours été précieux.

Merci aussi à mes petits stagiaires : Séb, Marion, Katalina, Julien et Iulia, qui malgré mon encadrement dictatorial n'ont jamais rechigné à la tâche, et m'ont beaucoup aidé dans l'avancement de ma thèse.

Merci à Thibault et Sébastien de la plateforme de cytométrie pour leur expertise, leur bonne humeur et leur disponibilité (des fois...) ! Je suis devenu accro au FACS à cause de vous les gars !

Merci à toutes les personnes du CIRI qui ont apporté des réponses à mes questions dès que j'en ai eu besoin : Marie-Cécile Michallet, Antoine Marçais, Marc Vocanson, Ozami Kanagawa, Thierry Walzer, Kévin Dhont, Cyrille Mathieu... Merci aux supers secrétaires de la tour pour votre bonne humeur sans égal : Véro, Céline, Ludo...

Enfin et surtout, merci à Mathilde et à Maman, Papa, Gégé, Mamie, Pépé, Max et toute ma famille, mais aussi à mes supers colocos Rémy et Raph de m'avoir soutenu pendant ces 4 ans, et d'avoir accepté que je fasse passer mon travail avant tout le reste pendant cette période. On se rattrapera !

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cell
ADN	Acide DéoxyriboNucléique	LTi	Lymphoid Tissue inducer cell
AFC	Antibody-Forming Cell	MadCAM	Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule
Ag	Antigène	MALT	Mucosae Associated Lymphoid Tissue
AID	Activation Induced cytidine Deaminase	mDC	myeloid Dendritic Cell
ALD	Alcoholic Liver Disease	MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
APRIL	A PRoliferation Inducing Ligand	mIgA	IgA monomérique
ARN	Acide RiboNucléique	mLN	mesenteric Lymph Node
BAFF	B cell Activating Factor	NALT	Nasopharynx Associated Lymphoid Tissue
BALT	Bronchoalveolar Associated Lymphoid Tissue	NKT	Natural Killer T cell
BCR	B Cell Receptor	NO	Nitric Oxid
BM	Bone Marrow	PB	Plasmablaste
cDC	conventional Dendritic Cell	PC	Plasmocyte
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PD-1	Programmed Death-1
CSR	Class Switch Recombination	PD-L1	Programmed Death-1 Ligand
CT	Cholera Toxin	pDC	plasmacytoid Dendritic Cell
DC	Dendritic Cell	pIgA	IgA polymérique
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	pIgR	polymeric Ig Receptor
DT	Diphtheria Toxin	PP	Plaques de Peyer
DTR	Diphtheria Toxin Receptor	PRR	Pattern Recognition Receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	PSC	Primary Sclerosing Cholangitis
ELISpot	Enzyme-Linked ImmunoSpot	QM	Quasi-Monoclonal
FAE	Follicular Associated Epithelium	RA	Retinoic Acid
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue	SC	Secretory Component
GC	Germinal Center	SED	Sub-Epithelial Dome
HEV	High Endothelial Venules	SFC	Spot-Forming Cell
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule	SI	Small Intestine
IFN	Interferon	SIgA	IgA sécrétoire
Ig	Immunoglobulin	TCR	T Cell Receptor
IL	Interleukin	TD	Thymo-Dépendant
iLC	innate Lymphoid Cell	TECK	Thymus Expressed ChemoKine
ILF	Isolated Lymphoid Follicle	T_{FR}	T follicular regulatory
iNOS	inducible Nitric Oxid Synthase	TfR	Tranferrin Receptor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif	TGF-β	Transforming Growth Factor beta
ITAMi	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif inhibitor	L_{TH}	Lymphocyte T helper
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif	TipDC	TNF and iNOS producing Dendritic Cell
LP	<i>Lamina Propria</i>	TLR	Toll-Like Receptor
LPS	LipoPolySaccharide	TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
		Treg	Lymphocyte T régulateur
		TSLP	Thymic Stromal LymphoPoietin
		VAP-1	Vascular Adressin

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
SOMMAIRE	6
INTRODUCTION.....	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1. CHAPITRE 1 - Les Immunoglobulines (Ig) A, structure et fonctions	10
1.1. Structure et Distribution des IgA	10
1.1.1. Les IgA monomériques	10
1.1.2. Des IgA polymériques aux IgA sécrétoires.....	12
1.2. Les IgA Participent Activement au Maintien de l'Homéostasie	14
1.2.1. L'exclusion antigénique permet d'éviter les réponses pro-inflammatoires contre la flore intestinale.....	14
1.2.2. Les IgA ont la capacité de neutraliser les pathogènes et les toxines associées	16
1.2.3. Les IgA participent à l'échantillonnage des antigènes intestinaux	17
1.2.4. Les récepteurs aux IgA : de la tolérance à l'inflammation	20
2. CHAPITRE 2 - Biologie de la réponse IgA	25
2.1. Les Plasmocytes Sécreteurs d'IgA	25
2.1.1. Du lymphocyte B naïf au plasmocyte à IgA	25
2.1.2. Au-delà de la capacité de sécrétion d'anticorps.....	32
2.2. Le Cycle de la Réponse IgA	34
2.2.1. Principaux sites inducteurs	34
2.2.2. La Lamina Propria intestinale : principal site effecteur de la réponse IgA.....	37
2.2.3. Les sites alternatifs de la réponse IgA.....	39
2.3. Les Acteurs Cellulaires et Moléculaires de la Réponse IgA.....	40
2.3.1. Rôle des sous-populations de cellules dendritiques	41
2.3.2. D'autres types cellulaires, d'origine hématopoïétique ou non, sont impliqués dans la réponse IgA	44
3. CHAPITRE 3 - L'axe intestin-foie	46
3.1. L'Anatomie du Foie est Adaptée à sa Fonction	46
3.1.1. Anatomie et physiologie générale du foie	46
3.1.2. Structure micro-anatomique des sous-unités hépatiques.....	47
3.1.3. L'axe entéro-hépatique et la détoxification des endotoxines d'origine intestinale.....	49
3.2. Le Foie : un Organe Lymphoïde ?	51
3.2.1. L'infiltrat lymphocytaire hépatique.....	52
3.2.2. Les cellules présentatrices d'antigènes hépatiques	54
3.2.3. Les mécanismes de domiciliation des leucocytes hépatiques	57
3.3. Foie et Tolerance Immunitaire.....	58
3.3.1. Transplantation et tolérance hépatique	59
3.3.2. Rôle du foie dans la tolérance orale.....	61
3.3.3. Rupture de tolérance et mise en place de réponses immunitaires efficaces en contexte infectieux.....	63
3.4. Role du Foie dans la Réponse Humorale à IgA : Etat des Lieux	64
3.4.1. Le transport hépatobiliaire des IgA.....	64
3.4.2. Réponse IgA intra-hépatique	66
3.4.3. IgA et maladies hépatiques alcooliques.....	67

OBJECTIFS	71
RESULTATS - PUBLICATION n°1	72
RESULTATS - PUBLICATION n°2	92
DISCUSSION	124
1. Les pDC ne sont pas nécessaires à la mise en place de la réponse IgA intestinale en conditions non-infectieuses.....	124
2. Le foie est un site effecteur de la réponse IgA intestinale	127
2.1. Caractérisation des cellules productrices d'IgA dans le foie.....	127
2.2. Origine des plasmablastes à IgA hépatiques	129
2.3. Hypothèses sur les mécanismes de homing des plasmablastes à IgA dans le foie	131
2.4. Rôle des IgA produites dans le foie.....	134
2.5. La réponse IgA hépatique en contexte pathologique.....	138
PUBLICATIONS ANNEXES.....	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175

INTRODUCTION

La muqueuse intestinale représente une interface de contact considérable avec l'environnement extérieur. D'une surface deux cent fois supérieure à celle de la peau, elle nous permet d'absorber efficacement les nutriments contenus dans l'alimentation et abrite un écosystème microbien composé de plusieurs milliards d'individus. Cette situation implique une exposition antigénique permanente et importante, en majorité représentée par des composés bactériens issus de la flore commensale. Le système immunitaire associé à l'intestin rassemble la plus grande population de cellules immunitaires de l'organisme et possède des caractéristiques particulières, distinctes du reste du système immunitaire et adaptées à cette situation antigénique. Le maintien de l'homéostasie intestinale repose sur deux stratégies anti-inflammatoires complémentaires permettant d'éviter le développement de pathologies inflammatoires contre des antigènes inoffensifs (antigènes alimentaires ou dérivés de la flore commensale normale), tout en permettant l'initiation de réponses protectrices lors d'infections virales, bactériennes ou parasitaires. Ainsi, la suppression des réponses T (tolérance orale) médiée par certains types de cellules dendritiques capables d'induire la différenciation de lymphocytes T régulateurs, permet d'empêcher le développement de réponses effectrices envers un antigène donné. En parallèle, la production d'immunoglobulines A (IgA) dans la lumière intestinale permet de contrôler la pénétration des bactéries du microbiote dans la muqueuse (IgA dites « naturelles », de faible affinité), tout en neutralisant les pathogènes et les toxines associées (IgA spécifiques, de forte affinité).

Si les IgA ne représentent que 15 à 20% des anticorps présents dans le sang, elles constituent 70% de la sécrétion d'immunoglobulines chez un individu, leur production étant presque exclusivement restreinte aux interfaces muqueuses. Cette production est assurée par une population de lymphocytes B spécialisée dans la sécrétion d'immunoglobulines : les plasmocytes. La différenciation des plasmocytes à IgA est initiée majoritairement dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Là, l'environnement cellulaire et cytokinique local, globalement anti-inflammatoire, oriente l'activation des lymphocytes B naïfs vers la commutation isotypique à IgA tout en leur instruisant une capacité de domiciliation muqueuse, via l'induction d'expression de molécules d'écotaxie particulières.

La *Lamina Propria* intestinale abrite la plus vaste population de plasmocytes de l'organisme, qui ensemble peuvent produire plus de 3g d'IgA par jour chez l'homme adulte. Néanmoins, il existe des sites alternatifs non-muqueux de production d'IgA, comme la moelle osseuse et la rate, et dont la participation dans la réponse à IgA globale n'est pas encore totalement comprise. De façon intéressante, quelques études sporadiques et anciennes ont suggéré que le foie pourrait constituer

un de ces sites alternatifs de production d'IgA. En effet, le foie, de par sa localisation anatomique et ses fonctions métaboliques, reçoit constamment des quantités importantes d'antigènes d'origine intestinale, impliquant ainsi d'exercer un deuxième niveau de régulation immunitaire dans le tissu hépatique. Dans ce sens, le foie est aujourd'hui reconnu comme un organe lymphoïde à part entière, riche d'importantes populations de cellules immunitaires spécifiques et adaptées à cette situation, globalement prônes à l'induction de la tolérance. Mon équipe d'accueil a en particulier démontré que la tolérance orale implique de façon séquentielle i) l'induction d'anergie et la délétion de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dans le foie, via l'action locale de cellules dendritiques plasmacytoïdes tolérogènes, et ii) la génération de lymphocytes T régulateurs dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin permettant le maintien systémique de la tolérance envers l'antigène donné.

L'arrivée constante d'antigènes intestinaux, le microenvironnement cytokinique anti-inflammatoire semblable à celui trouvé dans la muqueuse intestinale, et la présence de cellules présentatrices d'antigènes aux capacités tolérogènes font du foie un candidat potentiel pour l'induction et/ou l'expression de la réponse humorale à IgA. Mon projet de thèse a donc porté sur l'étude de la réponse IgA intra-hépatique, ainsi que de la contribution des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse IgA globale.

1. CHAPITRE 1

LES IMMUNOGLOBULINES (Ig) A, STRUCTURE ET FONCTIONS

1.1. STRUCTURE ET DISTRIBUTION DES IgA

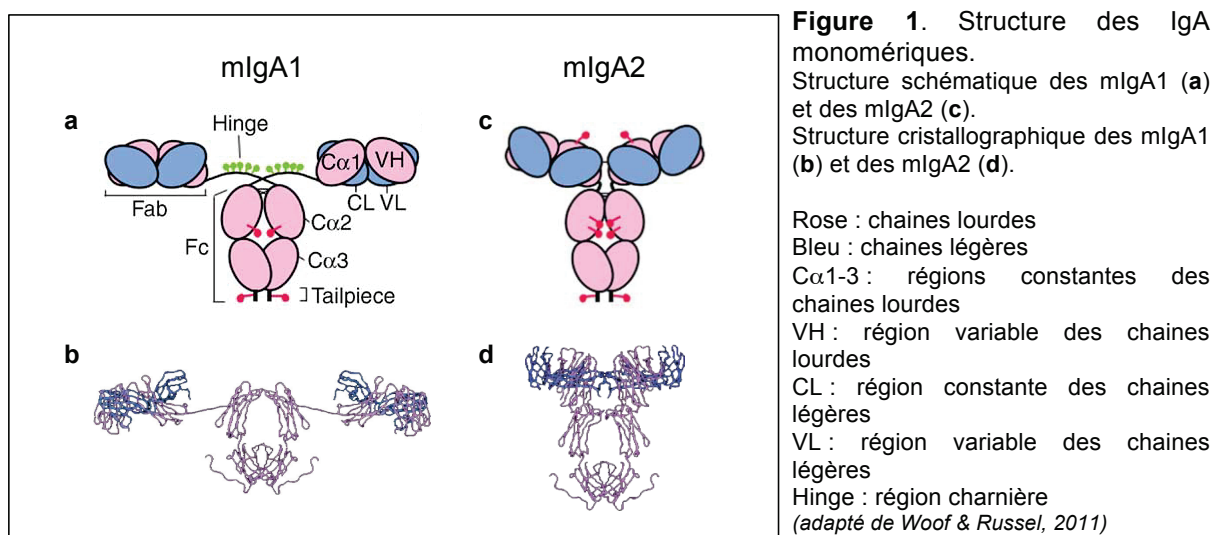
Les immunoglobulines A (IgA) représentent la sous-classe d'immunoglobulines la plus représentée chez l'homme et constituent un élément majeur de l'immunité adaptative. La production d'IgA est quasiment limitée aux interfaces muqueuses, particulièrement à l'intestin qui regroupe plus de 80% des cellules sécrétrices d'IgA (Fagarasan and Honjo, 2003), appelées plasmocytes à IgA. Chaque jour, la sécrétion d'IgA dans le tube digestif représente plus de 70% de la production totale d'immunoglobulines dans l'organisme entier (Macpherson and Uhr, 2004). La muqueuse intestinale, qui constitue l'interface de contact avec le milieu extérieur la plus importante en surface, en est ainsi largement recouverte. De plus, si les IgA sont fortement majoritaires dans les sécrétions muqueuses, elles sont aussi abondantes dans le sang (Woof and Kerr, 2006), mais sous une forme moléculaire majoritairement différente de celle observée dans les sécrétions muqueuses. En effet, contrairement aux autres isotypes d'immunoglobulines exclusivement sous forme monomérique (IgG, IgD) ou polymérique (IgM, IgE), les IgA ont la particularité de pouvoir présenter les formes monomérique (forme majoritaire dans le sérum humain) et dimérique ou polymérique (muqueuses).

1.1.1. Les IgA monomériques

Les IgA monomériques (mIgA) possèdent une structure classique d'immunoglobuline comprenant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, identiques deux à deux, arrangées en deux régions Fab (comprenant les domaines variables permettant la reconnaissance de l'antigène) et un fragment Fc permettant notamment les interactions avec des récepteurs cellulaires (**Figure 1**).

Chez la souris, un seul isotype d'IgA existe, alors qu'il se distingue deux sous-classes chez l'Homme : les IgA1 et les IgA2. Ces deux IgA vont se différencier par des variabilités de séquence dans leurs chaînes lourdes, dont la plus marquée se situe au niveau de la région charnière, très étendue pour les IgA1, et réduite pour les IgA2 (**Figure 1a et c**). Cette caractéristique confère aux IgA1 une

meilleure capacité de fixation simultanée de plusieurs antigènes, favorisant la création de complexes immuns (Woof and Kerr, 2006), tandis que les IgA2 sont plus résistantes aux protéases bactériennes fortement produites par la flore commensale intestinale (Kornfeld and Plaut, 1981). Les IgA1 et les IgA2 se différencient également par leurs glycosylations, qui représentent environ 6-7% de la masse moléculaire totale des IgA1, et atteint les 10% de la masse des IgA2. Ainsi, les 2 sous-classes présentent diverses N-glycosylations au niveau de leurs chaînes lourdes, dont la composition oligosaccharidique et la taille semblent pouvoir varier d'une molécule d'IgA à une autre. La région charnière des IgA1 comporte quand à elle entre 3 et 5 O-glycosylations, dont la structure peut également être variable. Ces N et O-glycosylations jouent un rôle majeur dans la biologie des IgA : elles permettent la fixation de la pièce J pour former des IgA polymériques (cf paragraphe 1.1.2), peuvent interagir avec certains motifs antigéniques bactériens, participant ainsi à la fonction de neutralisation des IgA (Woof and Mestecky, 2005), et permettre leur fixation à certains récepteurs aux IgA.



Les mIgA sont retrouvées principalement dans le sérum, représentant un peu plus de 50% des IgA sériques totales chez la souris (Delacroix et al., 1985) contre plus de 80% chez l'Homme (Delacroix et al., 1982a). Elles constituent ainsi les principales immunoglobulines sériques après les IgG, et sont représentées à 80-90% d'IgA1 (Woof and Mestecky, 2005). Le lieu de production des ces mIgA1 n'a pas encore été clairement établi, cependant il apparaît que la population de plasmocytes médullaires constitue la source majoritaire de ces IgA (Crago et al., 1984; Kutteh et al., 1982a).

Le rôle des mIgA sériques reste encore sujet à débat et n'a pas été totalement établi. Les IgA engendrent la formation de complexes immuns pouvant notamment inhiber l'activation du complément par les IgG ou les IgM par compétition (Griffiss and Goroff, 1983), et peuvent

également interagir avec différentes cellules myéloïdes via le récepteur spécifique au fragment Fc des IgA (Fc α RI) (van Egmond et al., 2001). Nous aborderons ce mécanisme plus en détail dans la partie suivante. En outre, lors de la formation de complexes immuns, le fragment Fc des IgA, contrairement aux IgM et aux IgG, ne peut pas interagir avec le C1q, ainsi les IgA ne peuvent pas activer la voie classique du complément. Néanmoins, quelques études ont proposé que, via leurs glycosylations, les IgA peuvent recruter des enzymes de type MBLASP (*Mannose-Binding Lectin Associated Serine Protease*) et ainsi activer le complément par la voie des lectines (Roos et al., 2001).

1.1.2. Des IgA polymériques aux IgA sécrétoires

La grande majorité des IgA présentes dans les sécrétions muqueuses est polymérique (principalement dimérique), et est constituées de monomères d'IgA joints grâce à la pièce J (*Joining chain*), également responsable de la polymérisation des IgM (**Figure 2a**). Les IgA polymériques (pIgA) produites par les plasmocytes de la *Lamina Propria* ont la capacité d'interagir de façon spécifique avec un récepteur exprimé sur la membrane basale des cellules épithéliales : le récepteur aux immunoglobulines polymériques (ou pIgR), encore appelé SC (*Secretory Component*) (**Figure 2b**).

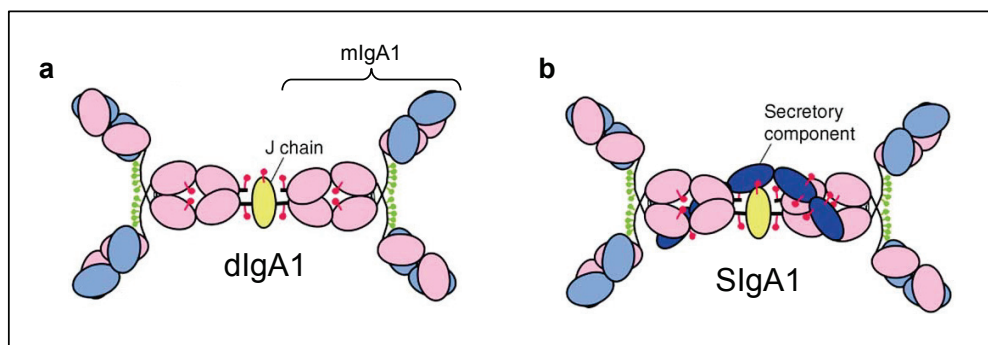


Figure 2. Structure des IgA dimériques et sécrétoires.

Structure schématique des dIgA1 (**a**) et des SIgA1 (**b**). (**a**) Les monomères d'IgA sont liés par la pièce J (jaune) via la formation de ponts disulfure au niveau terminal des chaînes C α 3 du fragment Fc. (**b**) L'interaction des dIgA avec le pIgR entraîne la fixation du composant sécrétoire (bleu foncé), lié de façon non-covalente à la pièce J et aux chaînes C α 3 des deux fragments Fc.

(Adapté de Woof & Russel, 2011)

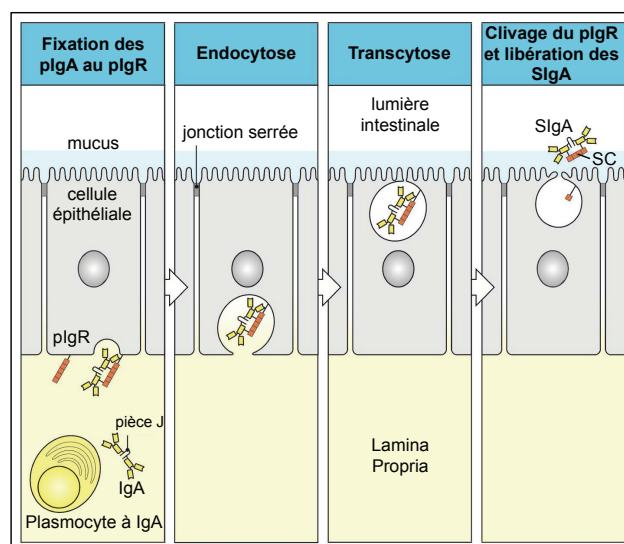
L'interaction entre le pIgR et les pIgA va mener à l'internalisation des IgA dans une vésicule d'endocytose qui sera transportée jusqu'à la membrane apicale de la cellule épithéliale : c'est la transcytose (**Figure 3**). Lorsque la transcytose est effectuée, le domaine extra-cellulaire du pIgR est clivé pour libérer les IgA dans la lumière des muqueuses. Les IgA libérées portent le nom d'IgA sécrétoires (SIgA), caractérisées par la présence d'un SC associé (fragment clivé du pIgR) favorisant la stabilité stérique des IgA et leur résistance aux protéases (Brandtzaeg and Johansen, 2005).

Chez l'Homme, la distribution des IgA1 et IgA2 diffère grandement selon le type de muqueuse : les IgA1 sont largement prédominantes au niveau du tractus respiratoire et des voies digestives supérieures (amygdales, estomac, duodénum), tandis que le ratio IgA1/IgA2 tend à s'équilibrer au fur et à mesure du tube digestif (**Figure 4**). Les IgA2 ne sont réellement dominantes qu'au niveau du colon (environ 2/3 des IgA produites) et de la muqueuse utérine (Brandtzaeg, 1999; Brandtzaeg and Johansen, 2005).

Figure 3. Le mécanisme de transcytose des IgA polymériques.

Les IgA polymériques, produites au niveau de la sous-muqueuse (Lamina Propria) par les plasmocytes, sont prises en charge par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR) exprimé sur la membrane basale des cellules épithéliales. Leur interaction mène à la formation d'une vésicule de transcytose permettant le transport des IgA jusqu'à la membrane apicale des entérocytes. Le pIgR va alors être clivé pour relâcher dans la lumière intestinale les IgA sécrétoires (SIgA) portant le composant sécrétoire (SC).

(source : Janeway's Immunobiology 8th, 2012)



Les deux sous-classes d'IgA possédant la même capacité de liaison au pIgR donc de transcytose, leur distribution différentielle dans les différentes muqueuses est une conséquence directe de la proportion de plasmocytes à IgA1 versus IgA2 dans ces différents tissus. Aujourd'hui encore les mécanismes à l'origine de cette distribution différentielle restent obscurs. Néanmoins la nature des antigènes présents dans ces zones semble impacter directement la classe des IgA produites : les antigènes protéiques favorisent préférentiellement la production d'IgA1, alors que les IgA2 sont plutôt produites en réponse à une stimulation par des antigènes polysaccharidiques (Lue et al., 1988; Mestecky and Russell, 1986). Des études menées sur des IgA de colostrum et de salive proposent d'ailleurs que les IgA1 possèdent une capacité plus importante à fixer les antigènes protéiques, alors que les IgA2 complexent plus efficacement les antigènes polysaccharidiques (Brown and Mestecky, 1985; Ladjeva et al., 1989).

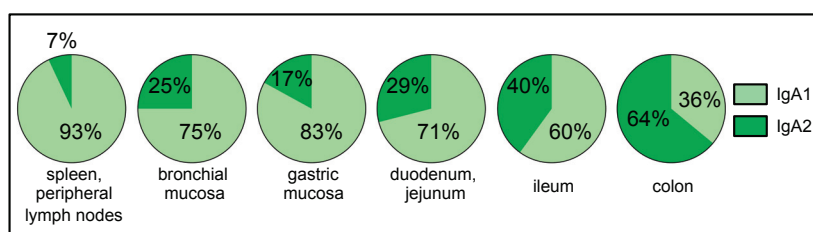


Figure 4. Distribution relative des IgA1 et IgA2 dans différents tissus.

Pourcentage relatif des sous-classes d'IgA produites par les plasmocytes et plasmablastes. (d'après Brandtzaeg & Johansen, 2005)

1.2. LES IgA PARTICIPENT ACTIVEMENT AU MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE

Les muqueuses constituent une surface de contact considérable avec l'environnement extérieur. La muqueuse intestinale, qui représente à elle seule une surface deux cent fois supérieure à la peau (Brandtzaeg, 2009) est exposée de façon chronique à une quantité massive d'antigènes issue de l'alimentation ou du microbiote et occasionnellement à des agents infectieux. En outre, le mutualisme établi entre l'hôte et les micro-organismes de sa flore commensale confère des avantages nutritionnels et métaboliques favorables aux deux partenaires (Bäckhed et al., 2005; Chorny and Cerutti, 2011). De surcroît, la flore commensale permet de limiter l'implantation de germes pathogènes par compétition (Sonnenburg et al., 2004). Cependant, les germes commensaux doivent être confinés à la lumière intestinale car leur translocation inappropriée dans la sous-muqueuse est susceptible d'engendrer l'émergence de pathobiontes pouvant entraîner des réactions inflammatoires fortement délétères pour l'hôte.

Ainsi, une diversité de mécanismes immunitaires permettent à la fois de développer une défense efficace contre les pathogènes, tout en limitant les réponses contre les antigènes inoffensifs. Une rupture/altération de la tolérance contre des antigènes issus de la flore commensale ou d'origine alimentaire, caractérisée par la mise en place d'une réponse inflammatoire, mène à des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique (Abraham and Cho, 2009) ou encore la maladie cœliaque (Dieterich et al., 1997).

La réponse IgA est aujourd'hui considérée comme un mécanisme finement adapté aux contraintes antigéniques liées aux muqueuses, et évoquées ci-dessus. Les premières découvertes majeures prouvant cette adaptation montraient que le contingent de plasmocytes à IgA intestinal était très fortement diminué chez les souris axéniques, et quasiment inexistant chez les nouveau-nés avant la colonisation par la flore commensale (Benveniste et al., 1971a; 1971b; Moreau et al., 1978). Ainsi, dans les différents compartiments des muqueuses (*Lamina Propria*, épithélium, lumière) les IgA contribuent à préserver l'homéostasie locale et systémique, en association avec les mécanismes de suppression des réponses T pro-inflammatoires (tolérance orale).

1.2.1. L'exclusion antigénique permet d'éviter les réponses pro-inflammatoires contre la flore intestinale

Le tube digestif des mammifères est colonisé dès la naissance par une flore bactérienne commensale composée de plusieurs milliards d'individus, représentés par plus de mille espèces (Eckburg et al., 2005). Cette flore est essentielle à la physiologie de son hôte en lui permettant la digestion de molécules qui ne pourraient pas être assimilées autrement et en apportant des

vitamines et autres nutriments absents de notre régime alimentaire. Mais elle est également indispensable au bon développement du système immunitaire muqueux, voire général, de l'hôte (Kato et al., 2014). Pour que ce mutualisme fonctionne, l'hôte doit mettre en place différentes stratégies limitant l'accès des germes commensaux à la circulation sanguine.

Un des premiers obstacles à la pénétration des micro-organismes dans la muqueuse intestinale est la barrière physique constituée par l'épithélium monostratifié, dont les cellules sont fortement liées par la formation de jonctions serrées. La majorité des entérocytes a un rôle d'absorption, mais certaines cellules (goblet cells) sont spécialisées dans la production du mucus épais contenant des composés antimicrobiens non-spécifiques (mucines, défensines) dont le rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale a été récemment illustré (Shan et al., 2013). De plus, les cellules épithéliales arborent une panoplie de récepteurs de l'immunité innée de type PRR (*Pathogen Recognition Receptors*), dont l'engagement par des ligands exprimés par la flore commensale (composés bactériens dérivés de la paroi, des flagelles ou acides nucléiques) induit la production de médiateurs immunologiques responsables du recrutement de cellules immunitaires et de la régulation de la réponse immunitaire locale (Izadpanah et al., 2001; Kagnoff and Eckmann, 1997). Ainsi, outre son rôle de barrière physique, l'épithélium est capable de moduler la conversation complexe qui est établie en le système immunitaire de l'hôte et la flore (Kato et al., 2014), permettant le développement de réponses immunitaires adaptées.

Plusieurs mécanismes immunitaires adaptatifs sont mis en place afin d'assurer la plasticité et l'efficacité de cette relation symbiotique, dont un des principaux est directement lié aux IgA : l'exclusion antigénique. Les IgA sont omniprésentes dans la lumière intestinale et, grâce à leur structure polymérique, ont une forte capacité à complexer certains épitopes bactériens créant ainsi un véritable réseau (phénomène d'agglutination), qui empêche les bactéries d'adhérer à l'épithélium (**Figure 5a**). Il a d'ailleurs été montré que la plupart des bactéries commensales sont recouvertes par des IgA (Palm et al., 2014; van der Waaij et al., 1996).

De plus, des études ont proposé que les groupements glycanes associés au SC et aux chaînes lourdes constantes contribuent à ce processus d'exclusion antigénique, en limitant la mobilité bactérienne en se liant aux flagelles bactériens (Phalipon et al., 2002). En association avec le mucus, l'exclusion antigénique opérée par les IgA va assurer le confinement de la flore dans la lumière, et ainsi préserver l'hôte d'une diffusion systémique de bactéries commensales.

Enfin, les pIgA ont la capacité de complexer des antigènes – notamment issus de la flore – directement dans la *Lamina Propria* avant leur liaison au pIgR, et de les exporter dans la lumière intestinale par transcytose, via le pIgR (Kaetzel et al., 1991; Strugnell and Wijburg, 2010). Ce

mécanisme, appelé excrétion antigénique (**Figure 5b**), participe également à limiter l'accès de ces antigènes aux cellules de l'immunité présentes sous la muqueuse.

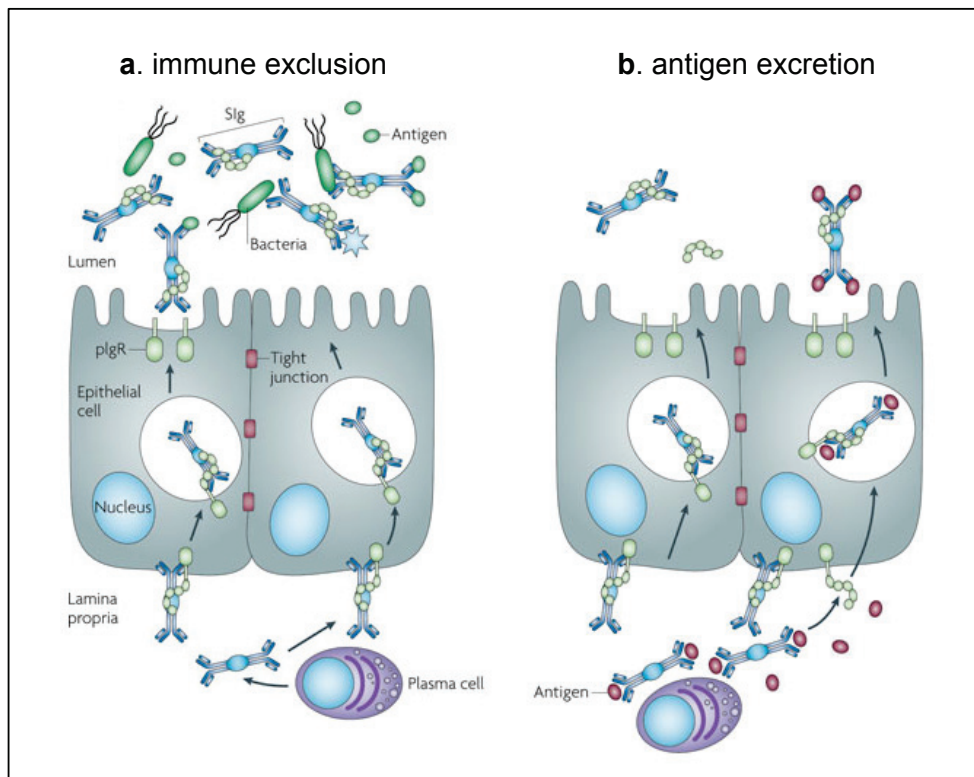


Figure 5. Les IgA permettent de limiter la pénétration d'antigènes dérivés de la flore et d'évacuer ces mêmes antigènes lorsqu'ils passent la barrière épithéliale.

(a) L'exclusion antigénique : les SIgA neutralisent les bactéries dans la lumière afin d'éviter leur adhésion, voire invasion des cellules épithéliales. (b) L'excrétion antigénique : les pIgA fixent les antigènes situés dans la Lamina Propria et vont les exporter jusqu'à la lumière via leur transcytose.

(adapté de Strugnell & Wijburg, 2005)

1.2.2. Les IgA ont la capacité de neutraliser les pathogènes et les toxines associées

Les muqueuses constituent la principale voie d'entrée dans l'organisme des pathogènes, bactéries, virus et parasites. Les SIgA jouent un rôle primordial dans la défense contre ces pathogènes et leurs toxines. La génération d'IgA de forte affinité, spécifiques d'épitopes antigéniques critiques portés par ces pathogènes, permet de limiter leur pénétration dans l'épithélium et la muqueuse (Mantis et al., 2011). Par des mécanismes semblables à ceux décrits pour l'exclusion antigénique, les SIgA vont par exemple complexer les bactéries pathogènes dans la lumière intestinale, limitant ainsi leur mobilité et leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. Les toxines produites par ces

bactéries vont être également efficacement neutralisées par inhibition de leur liaisons aux molécules cibles (Woof and Mestecky, 2005).

De plus, il a été démontré que les IgA sont capables de se lier et de neutraliser des protéines virales ou des toxines directement dans les cellules épithéliales. Les plgA en cours de transcytose vont neutraliser les pathogènes après fusion de la vésicule de transcytose avec une vésicule d'endocytose contenant des virus ou des toxines provenant de la lumière, ou avec un endosome contenant des protéines virales néo-synthétisées dans une cellule infectée (Strugnell and Wijburg, 2010). Par excrétion antigénique, les complexes ainsi formés sont rejetés dans la lumière afin d'être éliminés, par le péristaltisme intestinal par exemple. Ce dernier mécanisme, nommé neutralisation intracellulaire (**Figure 6**), a fait l'objet de plusieurs études *in vitro* montrant sa pertinence dans le cadre de l'infection par différents virus dont influenza et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Bomsel et al., 1998; Wright et al., 2008), mais ce rôle reste à démontrer *in vivo*.

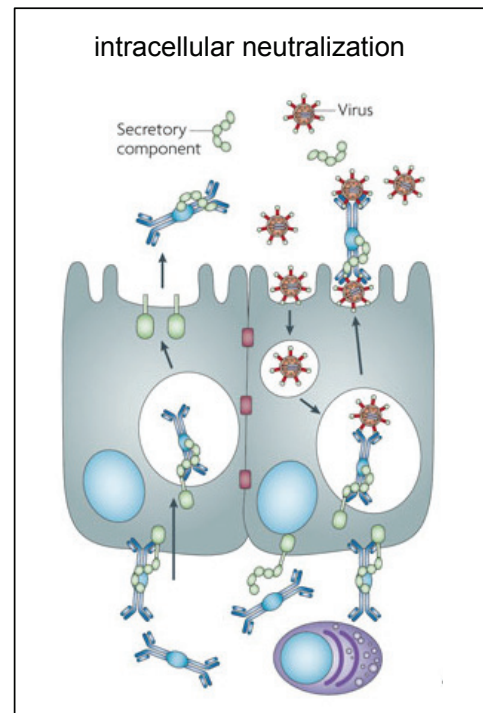


Figure 6. Les IgA sont capables de neutraliser des antigènes intracellulaires durant leur transcytose.

(adapté de Strugnell & Wijburg, 2005)

1.2.3. Les IgA participent à l'échantillonnage des antigènes intestinaux

Afin d'adapter au mieux la réponse immunitaire au contexte antigénique local, le système immunitaire associé à l'intestin (ou GALT) a besoin d'échantillonner perpétuellement le contenu de la lumière intestinale. Les plaques de Peyer sont des structures lymphoïdes secondaires sub-épithéliales macroscopiques, distribuées le long de l'intestin grêle du côté anti-mésentérique. Chez l'humain adulte, on peut en dénombrer jusqu'à 200, regroupées préférentiellement dans la partie médiane (jéjunum) et terminale (iléon) de l'intestin. Les plaques de Peyer constituent des éléments primordiaux dans l'initiation des réponses immunitaires intestinales. A la différence des ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer sont enrichies en lymphocytes B (75-85% contre 30-40% dans les ganglions périphériques), et ne disposent pas de système lymphatique afférent (**Figure 7b**).

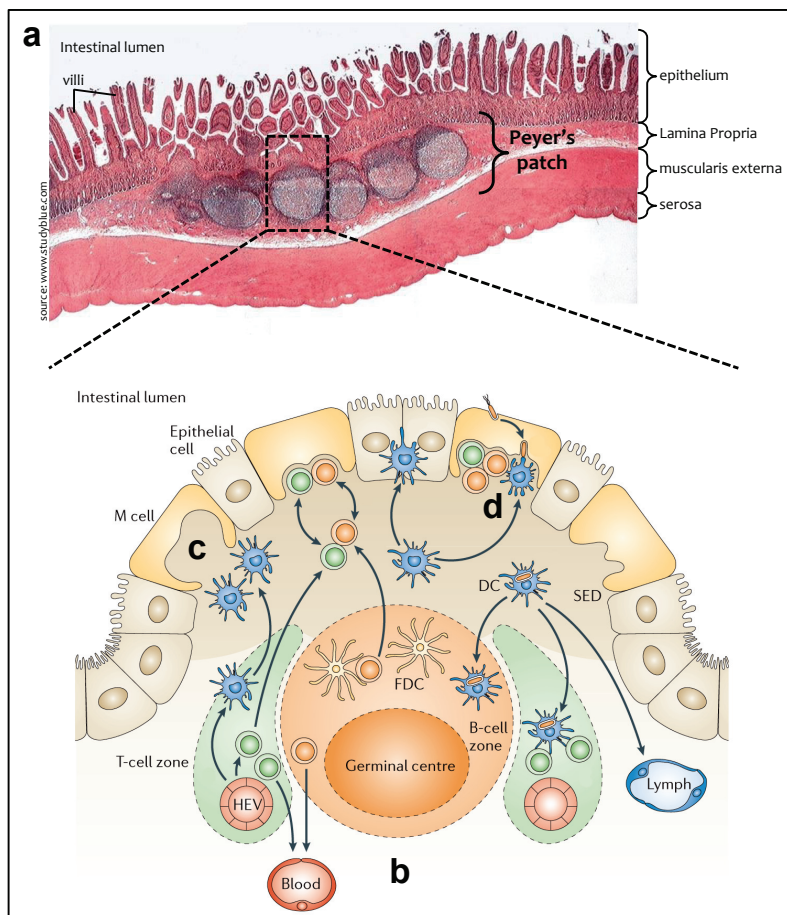


Figure 7. Structure des plaques de Peyer.

(a) Coupe histologique colorée d'intestin grêle au niveau d'une plaque de Peyer. On y distingue nettement plusieurs follicules.

Bas de l'image : représentation schématique d'une plaque de Peyer présentant un follicule B et des zones T interfolliculaires (b), un épithélium de type FAE présentant des cellules M caractéristiques (c) accueillant dans les poches intraépithéliales des cellules de l'immunité recrutées par chimiotactisme (d).

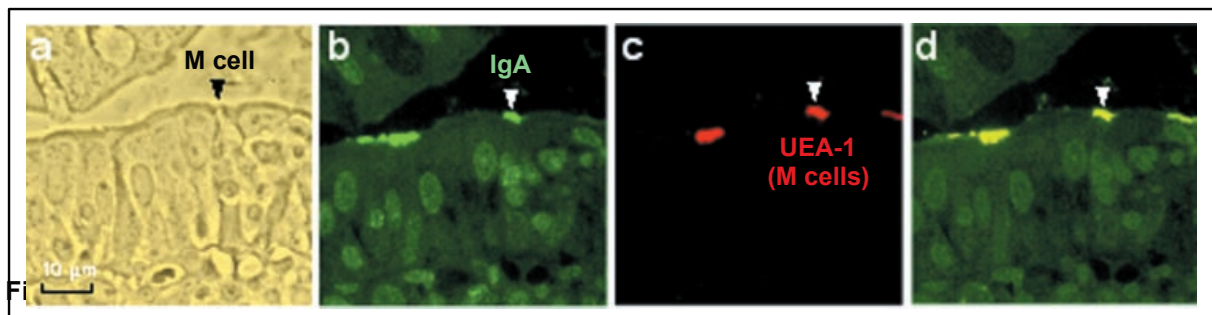
HEV : veinule à endothélium épais
SED : dôme sous-épithélial
DC : cellule dendritique
FDC : cellule dendritique folliculaire

(adapté de Neutra & Kozlowski, 2006)

En effet, leur localisation en surface de la paroi intestinale permet un contact antigénique direct de leur épithélium avec les antigènes de la lumière. Le dôme sous-épithélial (SED) est pourvu d'un épithélium caractéristique appelé FAE (*Follicle-Associated Epithelium*) constitué d'une majorité d'entérocytes et comportant des cellules épithéliales spécialisées caractéristiques dénommées cellules Microfold, ou cellules M, qui ne produisent pas d'enzymes digestives (**Figure 7c**). L'extrémité apicale des cellules M est dépourvue de microvillosités et de l'épais glycocalix, ce qui favorise la capture et l'internalisation d'antigènes, notamment particuliers (Frey et al., 1996; Mantis et al., 2000). La membrane basale des cellules M est fortement invaginée, créant une poche intra-épithéliale accueillant différents types de cellules immunitaires, notamment des cellules dendritiques (DC) et des macrophages (Farstad et al., 1994), recrutés par chimiotactisme (Iwasaki and Kelsall, 2000) (**Figure 7d**). Cette particularité structurale permet de rapprocher les cellules immunitaires à quelques microns d'intervalle de la source d'antigènes.

Les cellules M ont une forte capacité de transport d'antigènes, véhiculant par transcytose des composés bactériens, viraux, ou dérivés de l'alimentation depuis la lumière intestinale vers les cellules immunitaires regroupées au pôle basal. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les

cellules M capturent ces antigènes commencent à peine à être décryptés. Il a été démontré notamment que la glycoprotéine 2 exprimée sur la membrane des cellules M peut interagir spécifiquement avec des composés présents dans la paroi de certaines bactéries commensales gram-négatives (Hase et al., 2009; Mantis et al., 2000). En outre, il a été proposé il y a plus de vingt ans que les SIgA adhèrent spécifiquement aux cellules M au niveau du FAE. Ces premiers travaux montrent que les lapins nouveau-nés présentent des SIgA provenant du lait maternel adhérant spécifiquement aux cellules M, et pas aux cellules épithéliales adjacentes (Roy and Varvayanis, 1987). Cette observation a été confirmée plus tard *in vivo* chez la souris, dans un modèle d'injection d'IgA marquées dans une boucle intestinale ligaturée (**Figure 8**), proposant ainsi une expression d'un récepteur spécifique aux IgA à la surface des cellules M (Mantis et al., 2002).



Après injection d'IgA murines biotinylées dans une boucle intestinale ligaturée et incubation de 40min, des coupes sont réalisées et marquées pour détecter les IgA biotinylées et la surface des cellules M (anti-UEA-1). Observations par microscopie en contraste de phase (a) et fluorescence : (b) IgA, (c) cellules M, (d) images superposées.

(adapté de Mantis et al, 2002)

Depuis, il a été clairement mis en évidence que les SIgA complexées avec des antigènes de la flore commensale peuvent être délivrées grâce aux cellules M jusqu'aux cellules immunitaires sous-jacentes à l'épithélium: c'est la transcytose inverse (Kadaoui and Corthésy, 2007). Bien que la membrane apicale des cellules M ou des entérocytes des PP ne semble pas exprimer de récepteur spécifique aux IgA (Brandtzaeg and Bjerke, 1990; Pappo and Owen, 1988), une étude récente a permis d'identifier Dectin-1, une lectine de type C possédant des domaines de fixation aux β -glucans, comme responsable de la fixation spécifique de complexes SIgA-antigène à la surface des cellules M et de la transcytose inverse d'IgA (Rochereau et al., 2013). De façon intéressante, seuls les SIgA2 ont la capacité de réaliser la transcytose inverse, propriété directement liée à la structure de la région charnière (une délétion de la région charnière confère aux IgA1 la capacité de réaliser la transcytose inverse).

1.2.4. Les récepteurs aux IgA : de la tolérance à l'inflammation

Il est désormais clairement établi que les différentes formes d'IgA peuvent interagir avec une multitude de récepteurs cellulaires, dont certains ne sont pas strictement spécifiques des IgA, et dont les rôles respectifs ne sont pas encore clairement élucidés.

- *Le plgR (récepteur aux immunoglobulines polymériques) :*

L'interaction non-covalente des plgA avec le plgR a été largement étudiée et décrite, et implique la chaîne constante C α 3 des chaînes lourdes ainsi que la pièce J (Woof and Russell, 2011). Comme évoqué précédemment, cette interaction permet la transcytose des plgA à travers l'épithélium afin de fournir constamment des SIgA dans la lumière intestinale, dont le rôle est primordial dans le maintien de l'homéostasie. Le plgR peut également interagir avec les IgM polymériques (reliées par la pièce J) et permettre leur transcytose. Ainsi, il est connu que chez les patients atteints d'un déficit en IgA (le déficit immunitaire le plus courant), une compensation par la sécrétion d'IgM permet le plus souvent de maintenir un état asymptomatique (Pabst, 2012; Singh et al., 2014). Cependant, certains patients présentent des troubles allergiques, des manifestations d'auto-immunité, ou encore une susceptibilité accrue aux infections (Aghamohammadi et al., 2009). Ces observations cliniques sont corrélées avec les études expérimentales montrant que des souris déficientes en IgA (IgA^{-/-}) sont plus sensibles aux infections bactériennes pulmonaires (Furuya et al., 2013; Rodríguez et al., 2005), proposant ainsi que les IgA sont par nature des éléments clés irremplaçables dans les processus d'immuno-régulation dans les tissus muqueux.

- *Le Fc α RI (récepteur du fragment Fc des IgA) :*

Le Fc α RI (ou CD89) est le seul récepteur spécifique aux IgA décrit chez l'Homme. Si l'existence d'un équivalent a été proposée chez la souris (Pabst, 2012), aucune étude n'a permis d'identifier clairement un tel récepteur (Reljic, 2006). L'expression du Fc α RI est limitée aux cellules immunitaires de la lignée myéloïde : neutrophiles, éosinophiles, monocytes et certains sous-types de cellules dendritiques et de macrophages, comme les macrophages hépatiques: les cellules de Kupffer. L'expression du Fc α RI est constitutive et indépendante de l'interaction avec son ligand (les patients IgA-déficients ont un niveau d'expression du récepteur identique aux individus sains), mais selon le type cellulaire son expression peut être stable, ou modulable par le microenvironnement (ligands bactériens, cytokines pro-inflammatoires,...) (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Il apparaît néanmoins que les macrophages et les cellules dendritiques de la muqueuse intestinale et urogénitale n'expriment pas ce récepteur (Smith et al., 2001).

Toutes les formes d'IgA peuvent interagir avec ce récepteur, via les chaînes constantes C α 3. Néanmoins, toutes les formes d'IgA n'ont pas la même affinité pour le Fc α RI : les mIgA et les pIgA sous forme libre se lient avec une affinité modérée, tandis que les complexes immuns IgA-antigène se lient avec une très forte affinité. Les sites d'interaction du Fc α RI (C α 3) et du pIgR (C α 2-C α 3) se recouvrant partiellement, la position du SC sur les SIgA empêche presque totalement leur liaison au Fc α RI (Woof and Kerr, 2006).

Le Fc α RI forme généralement un trimère via l'association à deux chaînes γ transmembranaires (FcR γ chain) portant chacune un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) intracytoplasmique, et permettant d'engager les mécanismes de signalisation cellulaire. Ainsi, la fixation de complexes immuns IgA-antigène va entraîner un pontage des Fc α RI menant à l'activation des motifs ITAM, qui à leur tour vont permettre de recruter diverses tyrosines kinases nécessaires aux cascades d'activation (**Figure 9a**). Ce processus engendre différents types de fonctions cellulaires comme la phagocytose, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la production d'espèces réactives de l'oxygène, favorise la présentation antigénique ou encore induit la production de cytokines pro-inflammatoires (Bakema and van Egmond, 2011). A l'inverse, la fixation de mIgA ou pIgA sériques libres au Fc α RI va induire une cascade de signaux inhibiteurs via les motifs ITAM (ITAMi), entraînant notamment la diminution de l'expression par la cellule des autres récepteurs aux fragments Fc (Fc μ R, Fc γ R, Fc ϵ R), empêchant ainsi l'activation des cellules par des complexes immuns à IgM, IgG ou IgE via leurs récepteurs spécifiques respectifs (**Figure 9b**).

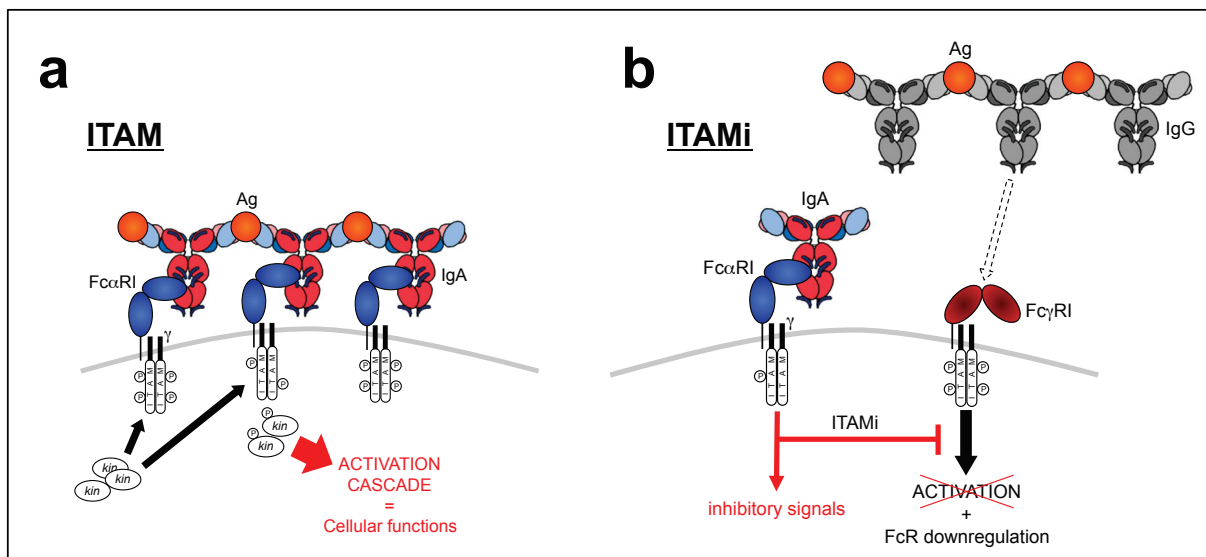


Figure 9. Le rôle bivalent du Fc α RI dans l'immunité.

(a) La liaison d'un complexe immunitaire IgA-antigène au Fc α RI entraîne une redistribution membranaire des Fc α RI et leur pontage, résultant en signaux activateurs forts. (b) La liaison d'IgA non-complexées par le Fc α RI provoque une cascade de signaux inhibiteurs empêchant l'activation de la cellule par des complexes immuns d'autres isotypes d'immunoglobulines via leurs récepteurs Fc respectifs.

Des travaux récents ont démontré qu'en présence d'IgA dimériques libres, des monocytes et des cellules dendritiques dérivées de monocytes sanguins stimulés par de l'IFN- γ et du LPS vont fortement diminuer leur production de facteurs pro-inflammatoires (IL-12, IP-10) ainsi que leur expression de molécules d'activation (CD64, CD80-86), dans un mécanisme dépendant de la signalisation du Fc α RI (Lecocq et al., 2013). De surcroît, la présence d'IgA va entraîner la production de CCL22 par ces cellules, une chimiokine connue pour recruter les lymphocytes T régulateurs (Layseca-Espinosa et al., 2013; Wei et al., 2006). Ainsi, même dans un contexte pro-inflammatoire, l'engagement du Fc α RI par des IgA libres peut orienter les phagocytes vers une fonction tolérogène.

Au niveau des muqueuses, l'expression du Fc α RI est très limitée. Les cellules dendritiques et les macrophages muqueux, à l'inverse de leurs homologues sanguins ou des tissus interstitiels périphériques, n'expriment pas le Fc α RI. Néanmoins, il a été proposé que les plgA synthétisées dans la *Lamina Propria* et n'ayant pas encore été fixées par le plgR peuvent opsoniser les bactéries pathogènes ayant réussi à passer la barrière épithéliale, et ainsi entraîner leur élimination via le Fc α RI exprimé par les neutrophiles (Vidarsson et al., 2001) recrutés en contexte inflammatoire (van der Steen et al., 2009). Enfin, le rôle de ce récepteur au niveau du foie sera lui évoqué dans le chapitre 3 de cette revue bibliographique.

Pour résumer, l'interaction entre les plgA, les mlgA sériques et le Fc α RI peut donc avoir un rôle bivalent dans l'immunité, avec des propriétés à la fois anti-inflammatoires et pro-inflammatoires selon le contexte.

- *Le Fc α / μ R (récepteur au fragment Fc des IgM et des IgA) :*

Ce récepteur a la capacité de fixer le fragment constant des formes polymériques des IgA et des IgM. Identifié à la fois chez l'Homme et la souris, il a fait l'objet de très peu d'études à l'heure actuelle, et sa fonction n'a pas été clairement établie. Chez l'Homme, il est exprimé constitutivement par les cellules dendritiques folliculaires des amygdales, ainsi que par les macrophages, les lymphocytes B et les plasmocytes de l'intestin (Wang et al., 2009). Chez la souris, il a été montré que ce récepteur pouvait entraîner l'internalisation de bactéries opsonisées par des IgM (Woof and Kerr, 2006). Ainsi, la distribution de ce récepteur et les résultats actuels laissent à penser qu'il pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire dans les muqueuses (Woof and Russell, 2011) mais les mécanismes restent à découvrir.

- *DC-SIGN (DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) :*

Il a été montré récemment que les SIgA peuvent interagir, via les glycosylations présentes sur les chaînes lourdes et principalement sur le SC, avec une lectine de type C exprimée par les

macrophages et certaines populations de cellules dendritiques : le DC-SIGN (ou CD209). Les cellules dendritiques présentes dans la poche intra-épithéliale des cellules M – n’exprimant pas le Fc α RI – peuvent ainsi par ce biais capter des complexes SIgA-antigène fournis par transcytose inverse. Certaines cellules dendritiques présentes dans la *Lamina Propria* intestinale sont également capables d’étendre leurs dendrites à travers l’épithélium afin d’échantillonner les antigènes directement dans la lumière intestinale (Chieppa et al., 2006). Il est donc proposé que l’interaction DC-SIGN–SIgA-antigène participerait à cet échantillonnage (Baumann et al., 2010). Il a également été démontré depuis chez la souris que l’engagement de SIGNR1 (homologue de DC-SIGN chez la souris) par des SIgA conditionne les cellules dendritiques à exercer une fonction toléro-gène, en favorisant notamment l’expansion de T_{reg} via la production d’IL-10 (Diana et al., 2013), une cytokine anti-inflammatoire clé dans les mécanismes de tolérance immunitaire, et favorable à la mise en place de la réponse IgA.

- *Dectin-1* :

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, les cellules M présentes au niveau du FAE des plaques de Peyer sont capables de réaliser la transcytose inverse de complexes SIgA2-antigène via l’interaction avec une lectine exprimée par les cellules M : Dectin-1. Cette interaction implique les résidus sialyls des glycosylations des chaînes constantes C α 1 des IgA, et semble nécessiter l’action d’une seconde lectine comme co-récepteur : Siglec-5. La découverte de ce récepteur a permis aux auteurs de proposer un modèle d’immunisation orale, utilisant des complexes SIgA2-p24 (protéine de capside du virus de l’immunodéficience humaine), induisant la production d’IgA spécifiques de la p24 détectables dans le sérum et les fécès (Rochereau et al., 2013). Le décryptage du mécanisme de transcytose inverse constitue donc une nouvelle avancée dans la mise en place de stratégies efficaces de vaccination muqueuse ciblant les cellules M.

- *Le récepteur à la transferrine (TfR)* :

Les dépôts d’IgA observés dans le mésangium rénal des patients atteints de néphropathies à IgA ont amené à découvrir que le récepteur à la transferrine (ou CD71), surexprimé par les cellules mésangiales chez les malades, était à l’origine de ce dépôt (Haddad et al., 2003). Les mécanismes d’interaction n’ont pas été décrits, mais il apparaît que le TfR a une affinité élevée pour les IgA1, préférentiellement monomériques (Moura et al., 2001). En corolaire, il a été montré que l’expression ectopique du TfR par l’épithélium intestinal favorise la transcytose inverse de complexes IgA1-antigène (d’origine alimentaire) et conduit à l’augmentation de réponses Th1 pro-inflammatoires spécifiques de ces antigènes dans les ganglions mésentériques, proposant ainsi un rôle du TfR dans la maladie cœliaque (Abed et al., 2014). Le TfR est également exprimé par certains

sous-types de cellules dendritiques chez l'Homme, permettant l'internalisation de complexes IgA-antigène par des cellules dendritiques présentant un phénotype immature (Pasquier et al., 2004).

- *Le FcRL4 (« FcR-like ») :*

Il y a maintenant un peu plus de dix ans a été décrit pour la première fois une famille de récepteurs « FcR-like » exprimés spécifiquement et de façon différentielle par les sous-populations de lymphocytes B (Miller et al., 2002). Ces récepteurs, malgré leur homologie structurale avec les FcR, ont été longtemps supposés n'avoir aucune interaction avec des immunoglobulines. Mais nous savons maintenant que l'engagement de ces récepteurs par les immunoglobulines régule la réponse du lymphocyte B en agissant directement sur la voie du BCR (*B-Cell Receptor*), via les voies ITAM (activation) et ITIM (inhibition) (Sohn et al., 2011). Des travaux récents ont montré que les IgA ont la capacité de se fixer au FcRL4 (Wilson et al., 2012), spécifiquement exprimé par une sous-population de lymphocytes B mémoires chez l'Homme (Ehrhardt et al., 2005). Les effets biologiques d'une telle interaction restent encore à définir.

- *Le récepteur à l'asialoglycoprotéine :*

Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (récepteur fixant les glycoprotéines sériques pour leur dégradation), est une lectine de type C exprimée à la surface des hépatocytes (principales cellules constituant le parenchyme hépatique). Il est capable de prendre en charge des pIgA1 sériques (interaction avec la région charnière), entraînant leur acheminement dans les voies biliaires pour leur recyclage dans le tube digestif (Mestecky et al., 1989; Stockert et al., 1982; Tomana et al., 1988). Néanmoins, le rôle de ce récepteur dans la biologie de la réponse IgA reste débattu (Schiff and Underdown, 1985).

2. CHAPITRE 2

BIOLOGIE DE LA REPONSE HUMORALE À IgA

2.1. LES PLASMOCYTES SECRETEURS D'IgA

Les plasmocytes représentent le stade terminal de la différenciation du lymphocyte B, et sont spécialisés dans la sécrétion d'anticorps : chaque cellule peut produire entre cent et mille anticorps par seconde. Ils constituent ainsi les principaux effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale. La muqueuse intestinale a la particularité d'abriter la plus grande population de plasmocytes de l'organisme, dont la quasi-totalité sécrète des plgA. Cette particularité biologique est la résultante d'un contexte environnemental et immunologique particulier menant à la différenciation préférentielle des lymphocytes B matures naïfs en précurseurs de plasmocytes à IgA, puis leur migration dans les tissus muqueux, où ils exercent une activité de sécrétion importante d'IgA une fois pleinement différenciés.

2.1.1. Du lymphocyte B naïf au plasmocyte à IgA

Les structures lymphoïdes secondaires du système immunitaire associé à l'intestin sont enrichies en lymphocytes B en comparaison aux organes lymphoïdes secondaires périphériques. Cet enrichissement constitue une ressource importante de précurseurs plasmocytaires. La commutation isotypique vers IgA constitue le processus par lequel un lymphocyte B naïf (IgD^+IgM^+) va acquérir l'expression d'IgA à sa surface. Ce mécanisme peut être induit par deux voies : une voie impliquant l'action de lymphocytes T auxiliaires « helper » (LT_H) ou voie thymo-dépendante (TD), et une voie dans laquelle l'interaction avec les LT_H n'est pas nécessaire, appelée voie thymo-indépendante (TI). La nature des antigènes reconnus ainsi que les signaux cytokiniques délivrés au lymphocyte B vont impacter de façon déterminante la voie de différenciation qui sera adoptée. En outre, malgré que les voies TD et TI soient de mieux en mieux décrites, et qu'il apparaît clairement qu'elles participent toutes les deux à la formation du contingent plasmocytaire à IgA muqueux (Macpherson et al., 2000), il n'a pas encore été possible de déterminer expérimentalement quelle est la contribution relative de chacune des deux voies dans la réponse IgA globale (Pabst, 2012).

- La commutation isotypique vers IgA :

Lors de la commutation isotypique vers IgA, les gènes des chaînes lourdes constantes des immunoglobulines vont être réarrangés afin que les régions codantes pour les domaines variables

(domaines V-D-J) se retrouvent jointes à la région codante des chaînes lourdes constantes alpha (« C α »). Ce procédé recombinaire va impliquer les séquences géniques « Switch » S μ et S α , ces dernières étant localisées juste en amont des régions C α . Chaque séquence S α est précédée d'un exon I α (*Intronic alpha*) et d'un promoteur permettant l'initiation de la transcription de séquences primaires non-codantes (α germline transcripts) lors de l'activation du lymphocyte B (**Figure 10a**). Ces séquences vont alors permettre de rendre les régions S α disponibles pour l'action d'AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*). L'enzyme AID est cruciale pour tout processus de commutation isotypique, ainsi que d'autres processus de réarrangement géniques comme l'hypermutation somatique (Honjo et al., 2004; Muramatsu et al., 2000; 1999). Ainsi, dans un mécanisme dépendant d'AID, les régions VDJ des chaînes lourdes vont venir être juxtaposées à la région C α via la formation d'une boucle d'épissage (**Figure 10b**), qui sera par la suite excisée sous une forme caractéristique nommée boucle d'excision α (« α -circle transcripts » - **Figure 10c** - (Kinoshita et al., 2001)). La séquence génique VDJ-C α obtenue permet finalement l'expression d'IgA par le lymphocyte B (Cerutti, 2008).

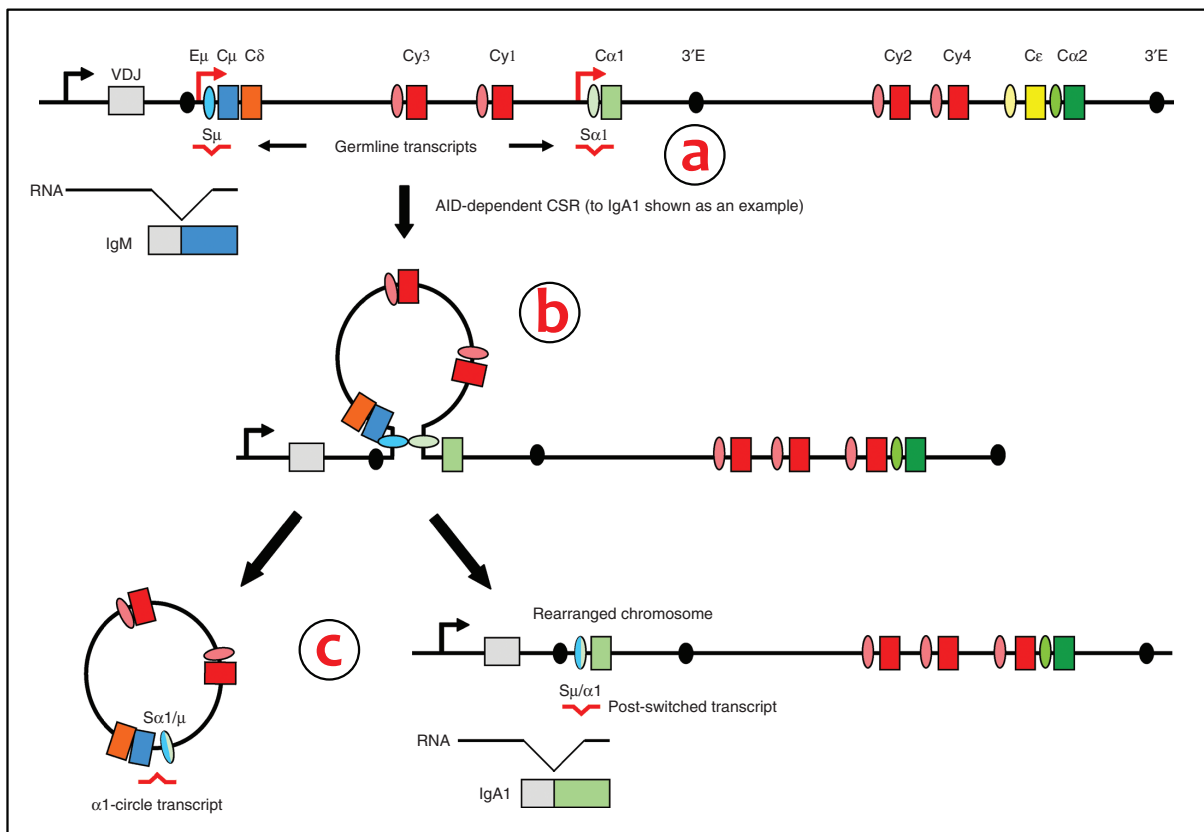


Figure 10. Schéma du déroulement de la commutation isotypique vers IgA1.

(a) Initiation de la commutation isotypique par la transcription des régions Switch. (b) Formation de la boucle d'épissage via l'action d'AID. (c) Obtention d'un transcrit circulaire α caractéristique et du gène de l'IgA1 arrangé. (tiré de Brandtzaeg & Johansen, 2005)

La courte durée de vie des transcrits primaires, des boucles d'excision α ainsi que l'expression transitoire d'AID dans un lymphocyte B en font les marqueurs les plus sensibles pour la détection de la commutation isotypique vers IgA *in vivo* (Cerutti et al., 2002; Kinoshita et al., 2001). L'initiation de ce processus est dictée de façon critique par les signaux moléculaires apportés par le microenvironnement du lymphocyte B (interactions directes avec d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T ou des cellules dendritiques, contexte cytokinique...).

- *La voie de différenciation thymo-dépendante (TD) :*

Les antigènes protéiques engendrent majoritairement la production d'anticorps très spécifiques et souvent neutralisants. Chez la souris, les lymphocytes B préférentiellement impliqués dans cette voie sont les lymphocytes de type B-2 (ou conventionnels), retrouvés majoritairement dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires et dans le sang. Si les lymphocytes B-2 naïfs matures sanguins rencontrent leur antigène sous forme libre directement dans la circulation, les lymphocytes B muqueux reçoivent principalement l'antigène via les cellules M au niveau du SED des plaques de Peyer (**Figure 11a**).

La reconnaissance de l'antigène par le BCR constitue le premier signal d'activation, et va résulter en l'internalisation de l'antigène et son apprêtement en vue de sa présentation aux lymphocytes T, sous forme de complexes CMH II-peptide. Les lymphocytes B ainsi activés migrent ensuite vers la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Ici, ils recevront le second signal d'activation par un lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire de type 2 (T_{H2}) spécialisé : le lymphocyte T « follicular helper » (T_{FH}). En effet, l'interaction entre les T_{FH} et les LB spécifiques de l'antigène met en jeu la reconnaissance par le TCR des complexes CMH-peptides présentés par le LB, renforcée par le contact entre la molécule de CMH de classe II et la molécule CD4. L'agrégation du CD40, exprimé constitutivement par les lymphocytes B, par son ligand (CD40L/CD154), exprimé de façon transitoire par les lymphocytes T activés, constitue le deuxième signal nécessaire à la mise en place de la réaction du centre germinatif (commutation isotypique, maturation d'affinité), et caractérise la voie de différenciation TD (**Figure 11c**). Des travaux récents ont proposés que les T_{FH} retrouvés dans les sites inducteurs de la réponse IgA (plaques de Peyer, ILF) ont la particularité de se différencier à partir de lymphocytes T régulateurs (Tsuji et al., 2009). Néanmoins, ce constat a par la suite été réfuté, proposant alors que les T_{FH} participants à la réponse IgA TD proviennent majoritairement de la différenciation de T_{H17}, et non de T_{reg} (Hirota et al., 2013; Milpied and McHeyzer-Williams, 2013).

L'interaction entre le lymphocyte B et le T_{FH} conduit à la mise en place de la réaction extra-folliculaire, caractérisée par la formation de foyers primaires d'expansion clonale localisés dans les zones T, au sein desquels se différencieront les premiers LB effecteurs sécrétant des anticorps : les plasmablastes. Ces cellules ont la particularité de présenter un phénotype intermédiaire entre le LB

et le plasmocyte, et sont prolifératifs. Ils permettent une première vague de production d'immunoglobulines spécifiques de l'antigène, menant à la formation de complexes immuns.

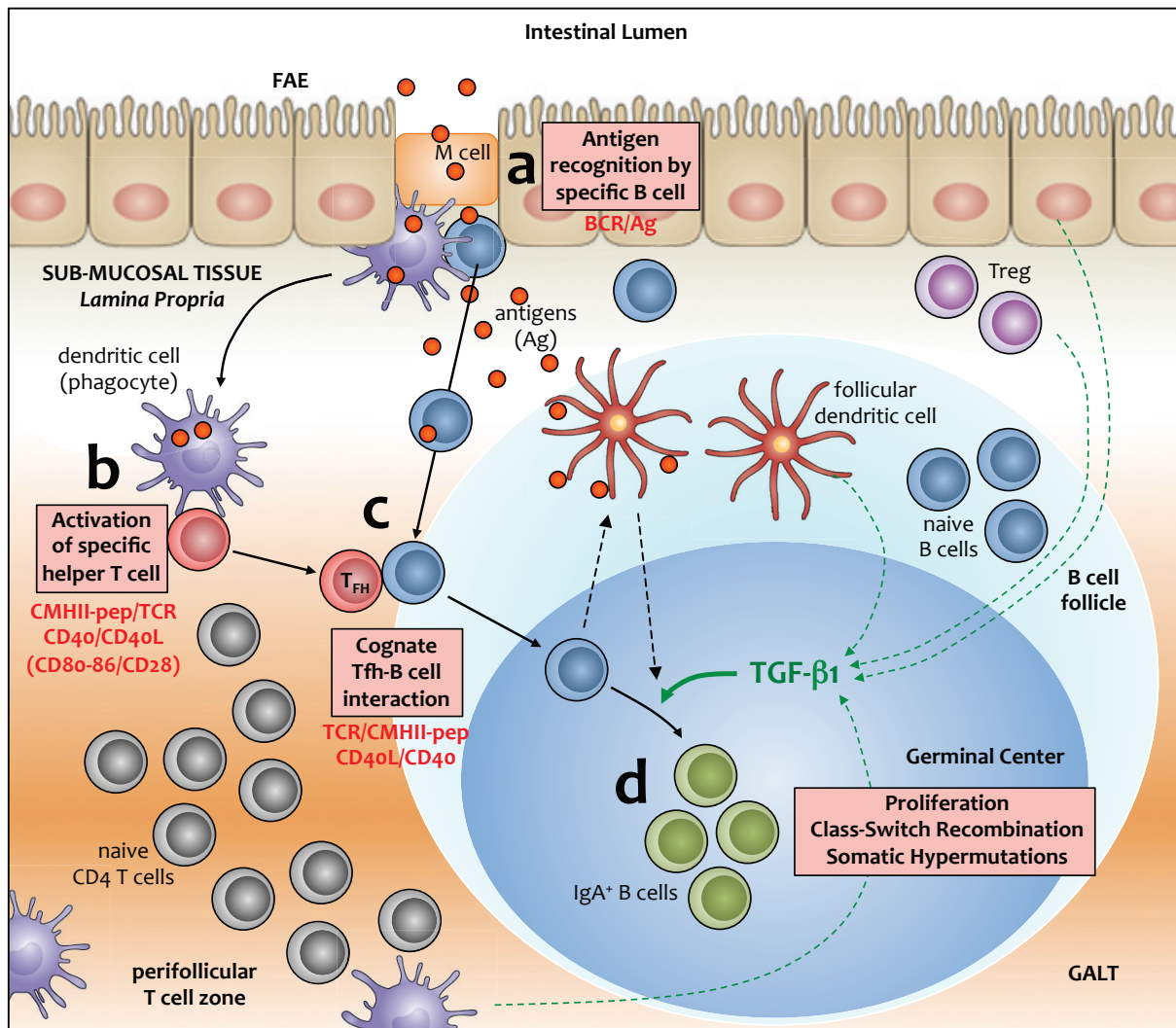


Figure 11. Différenciation IgA par la voie thymo-dépendante (TD).

(a) Capture de l'Ag par le clone de LB naïf spécifique au niveau des cellules M. (b) Présentation de peptides antigéniques par une cellule dendritique à un LT menant à sa différenciation en T_{FH}. (c) Présentation de peptides antigéniques par le LB aux T_{FH} spécifiques de l'Ag menant à l'activation complète du LB. (d) Formation de centres germinatifs par les LB activés permettant la différenciation de plasmablastes IgA⁺ spécifiques de l'Ag.

Une partie des LB va néanmoins migrer jusqu'au follicule pour y engager la réaction du centre germinatif. Ce processus, décalé de 2 à 3 jours par rapport aux réactions extra-folliculaires, va permettre à certains clones B spécifiques de l'antigène de réaliser leur maturation d'affinité (procédé durant lequel l'enzyme AID va induire des mutations ponctuelles dans les régions variables des immunoglobulines afin d'augmenter l'affinité du BCR pour l'antigène) et subir une expansion massive. Les LB du centre germinatif reviendront régulièrement tester leur BCR sur les cellules dendritiques folliculaires présentant l'Ag sous forme de complexe immun afin de sélectionner les clones les plus affins pour l'antigène. Les clones ne reconnaissant plus l'antigène

sont éliminés par apoptose. Les clones sélectionnés se différencieront en lymphocytes B mémoire ou en plasmocytes (**Figure 11d**).

Dans la muqueuse, la nature des antigènes et le contexte cytokinique du micromilieu orientent de façon presque obligatoire la commutation isotypique vers IgA (Fagarasan and Honjo, 2003; Macpherson et al., 2008). C'est notamment la présence de TGF- β 1, une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires, qui va dicter ce phénomène (Islam et al., 1991; Shockett and Stavnezer, 1991). Cette cytokine est produite par de nombreux types cellulaires dans l'intestin : les cellules épithéliales (Dahan et al., 2007), certains sous-types de cellules dendritiques (Païdassi et al., 2011), et différents sous-types de lymphocytes T, plus particulièrement les lymphocytes T régulateurs (Rubtsov and Rudensky, 2007). Ainsi, lorsque le lymphocyte B va rencontrer son antigène, le signal CD40-CD40L fourni par le T_{FH} ainsi que le TGF- β 1 présent en quantité importante dans le microenvironnement sont nécessaires et suffisants pour induire sa commutation isotypique vers IgA (Cazac and Roes, 2000; Shi and Stavnezer, 1998). La différenciation plasmocytaire est ensuite principalement influencée par l'IL-10 (Defrance et al., 1992; Rousset et al., 1992), également sécrétée principalement par les cellules dendritiques et les T_{reg}, et l'IL-6 produite par les cellules stromales (Jego et al., 2001). Les IgA produites par ces plasmocytes permettent une neutralisation efficace des protéines virales, de composés protéiques bactériens ainsi que des toxines. Cependant, la production d'IgA de forte affinité débute entre 5 à 7 jours après l'activation initiale des lymphocytes B, ce qui représente un délai long pour la mise en place d'une réponse contre des antigènes hautement réplicatifs (bactéries commensales) ou contre les antigènes alimentaires (Cerutti and Rescigno, 2008).

- *La voie de différenciation thymo-indépendante (TI) :*

Afin de synchroniser au mieux la réponse IgA muqueuse avec le contexte antigénique, les lymphocytes B peuvent emprunter une voie de différenciation ne nécessitant pas d'interaction avec un lymphocyte T auxiliaire ni de structure lymphoïde organisée, et permettant la production d'IgA en 3 à 5 jours maximum (Macpherson et al., 2000). Les IgA produites sont de faible affinité et sont poly-réactifs (IgA dites « naturelles »), mais effectuent l'exclusion antigénique, et par conséquent participent au maintien de la flore commensale (Macpherson and Uhr, 2004). Chez la souris, contrairement à la voie TD, la voie TI implique en grande partie les lymphocytes B-1, provenant de la cavité péritonéale et ayant des caractéristiques phénotypiques (CD5⁺ et IgM⁺⁺) et ontogéniques différentes des lymphocytes B-2 (Martin and Kearney, 2000; Martin et al., 2001). S'il n'existe à priori pas d'équivalent direct des B-1 chez l'Homme, certaines sous-populations de lymphocytes B, comme les B de la zone marginale, semblent également être impliquées

préférentiellement dans la voie TI (Weller et al., 2004). Cependant, il est à noter que la voie TI n'est pas strictement restreinte aux B-1.

L'activation des lymphocytes B-1 peut être réalisée indépendamment de la reconnaissance de l'antigène par le BCR, notamment via l'engagement des TLR (*Toll-Like Receptors*). C'est le cas pour le LPS (lipopolysaccharide – constituant majeur de la paroi des bactéries Gram-), un antigène TI de type 1, qui après engagement du TLR4 et en présence de TGF- β 1, induit la commutation isotypique vers IgA de lymphocytes B-1 naïfs *in vitro* (Coffman et al., 1989; Peng, 2005). Cependant, les mécanismes par lesquels les TLR engendrent une réponse IgA restent inconnus (Cerutti, 2008; Fagarasan and Honjo, 2000). Les antigènes TI de type 2, représentés principalement par des polysaccharides d'origine bactérienne (motifs antigéniques répétitifs), activent quand à eux les lymphocytes B via la reconnaissance par le BCR (Mond et al., 1995) (**Figure 12a**).

L'activation des lymphocytes B par la voie des TLR ou par le BCR *in vivo* semblent néanmoins nécessiter le pontage (grâce aux propriétés structurales répétitives de l'Ag) des récepteurs sur une zone donnée de la membrane, afin que le signal antigénique simultané permette l'initiation efficace des voies de transduction (Batista et al., 2001). La formation d'une synapse immunologique entre le lymphocyte B et les cellules dendritiques apparaît aujourd'hui comme un élément clé de la réponse TI. En effet, il a été démontré *in vivo* que les cellules dendritiques ont la capacité de capter un antigène sous forme de complexe immunitaire (reconnaissance via le fragment Fc) et de l'internaliser sans procéder à sa dégradation. Ainsi, elles véhiculent l'antigène sous sa forme native, et le recyclent régulièrement à leur surface, ce qui permet lors d'un contact avec un lymphocyte B la reconnaissance de l'antigène par le BCR (Balázs et al., 2002; Bergtold et al., 2005).

Dans la voie TI, deux cytokines clés ont été clairement identifiées comme étant indispensables à l'initiation de la commutation isotypique vers IgA (Castigli et al., 2004; 2005; Litinskiy et al., 2002). Ces cytokines font partie de la famille des TNF (*Tumour Necrosis Factor*) et possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles proches du CD40L : BAFF (*B-cell Activating Factor* – aussi connu sous le nom de BLyS chez l'Homme) et APRIL (*A Proliferation-Inductive Ligand*). La stimulation des cellules dendritiques par des composés microbiens via leurs TLR, ainsi que par la TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) produite par les cellules épithéliales intestinales (production dépendante de la stimulation des TLR également) va activer la production de BAFF et d'APRIL (He et al., 2007; Xu et al., 2007). Enfin, les cellules épithéliales peuvent elles-mêmes produire BAFF et APRIL après stimulation par des composés microbiens.

Trois types de récepteurs pour ces cytokines ont été identifiés sur les lymphocytes B, dont un est spécifique de BAFF (BAFF-R), et deux pouvant interagir avec les deux : TACI (*Transmembrane Activator and calcium-modulating Cyclophilin-ligand Interactor*) et BCMA (*B-Cell Maturation Antigen*).

Cependant, il apparaît que seul l'engagement de TACI permet de fournir les signaux nécessaires à la commutation isotypique vers IgA (He et al., 2010).

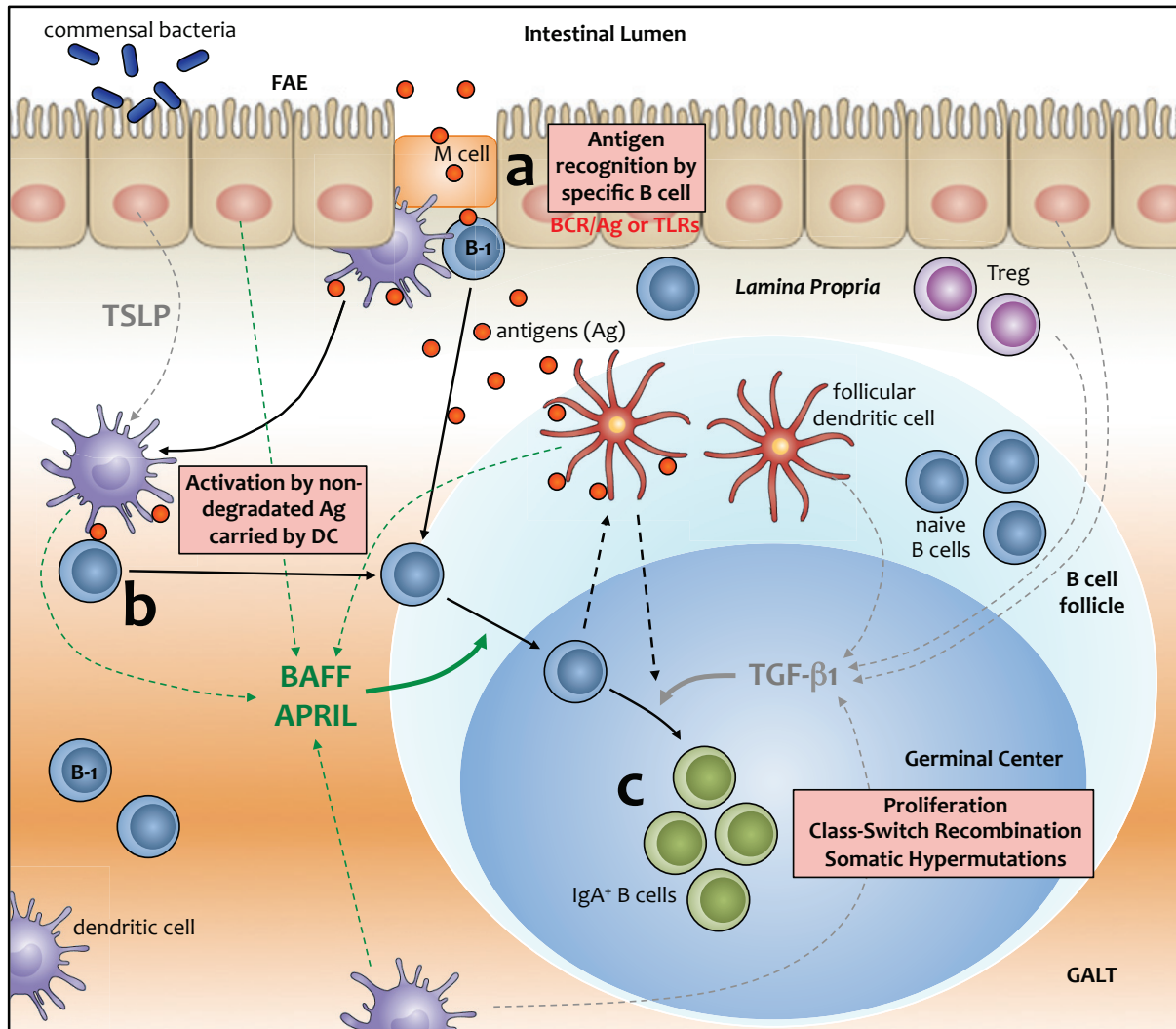


Figure 12. Différenciation IgA par la voie thymo-indépendante (TI).

(a) Capture de l'Ag par un LB naïf. (b) Présentation de l'Ag sous sa forme native par une cellule dendritique menant à l'activation du LB naïf. (c) Formation de centres germinatifs par les LB activés permettant la différenciation de plasmablastes IgA⁺ spécifiques de l'Ag.

En effet, les souris déficientes pour TACI ont un défaut de réponse IgA en réponse à un antigène TI, tandis que la réponse contre un antigène TD est normale (Bülow et al., 2001). Notons d'ailleurs que les lymphocytes B-1 expriment plus fortement TACI que les lymphocytes B-2 (Ng et al., 2006). Aujourd'hui, les mécanismes par lesquels TACI induit la commutation isotypique vers IgA n'ont pas été décrits.

Enfin, si les étapes tardives de la différenciation plasmocytaire semblent principalement être favorisées par la présence d'IL-10, un rôle de BAFF et APRIL n'est pas à écarter (Schneider, 2005). En

outre, plusieurs études ont montré que la différenciation des lymphocytes B1 en plasmocytes à IgA est fortement dépendante de l'IL-5 (Bao et al., 1998; Hiroi et al., 1999).

2.1.2. Au-delà de la capacité de sécrétion d'anticorps

Les plasmocytes ont longtemps été uniquement considérés comme des cellules dont le seul rôle est de produire une forte quantité d'anticorps. Mais depuis le début de cette décennie, plusieurs travaux originaux ont pu montrer que le rôle du plasmocyte dans l'immunité, comme la présentation d'antigène et la production de cytokines et de facteurs immuno-régulateurs.

Une étude a démontré que les plasmocytes différenciés spécifiques de l'antigène ont la capacité de réguler l'action des lymphocytes T_{FH} sur les lymphocytes B lors d'une nouvelle rencontre avec le même antigène. En effet, les plasmocytes conservent la machinerie cellulaire nécessaire à la dégradation de l'antigène (internalisé au stade du lymphocyte B) et à sa présentation aux lymphocytes $T\ CD4^{+}$: ils expriment le CMH-II et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. La présentation de l'antigène par le plasmocyte aux lymphocytes T naïfs dans la zone extra-folliculaire a pour effet d'inhiber leur différenciation en T_{FH} (**Figure 14a**). L'interaction directe du plasmocyte avec les T_{FH} différenciés va également inhiber leur fonction (baisse de production d'IL-21 et d'expression du répresseur transcriptionnel Bcl-6, qui sont deux éléments fonctionnels clés du T_{FH}). De ce fait, les plasmocytes sont capables d'exercer une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'activation de l'immunité humorale spécifique de l'antigène (Pelletier et al., 2010).

Par ailleurs, deux groupes de recherche ont montré que les plasmocytes à IgA intestinaux sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs *in vitro*. La première étude décrit l'expression de PD-L1 (*Programmed-Death Ligand 1*) par les plasmocytes à IgA et montre la conversion de lymphocytes T naïfs en T_{reg} lors d'expériences de co-cultures. En accord avec d'autres études démontrant le rôle important de la voie PD-1/PD-L1 dans la différenciation des T_{reg} (Francisco et al., 2009), les auteurs proposent ainsi que les plasmocytes à IgA participent au maintien de l'homéostasie en favorisant la différenciation de T_{reg} (Doi et al., 2012) (**Figure 14b**). La seconde étude propose que la différenciation de T_{reg} *in vitro* ne soit pas dépendante de la présentation de l'antigène, mais de leur production de facteurs solubles (**Figure 14c**), comme le TGF- β et l'acide rétinoïque (métabolite de la vitamine A). Cette même étude montre qu'une déplétion *in vivo* du contingent de plasmocytes à IgA par du bortezomib entraîne une baisse significative de la fréquence de T_{reg} dans le GALT (Kim and Kim, 2013).

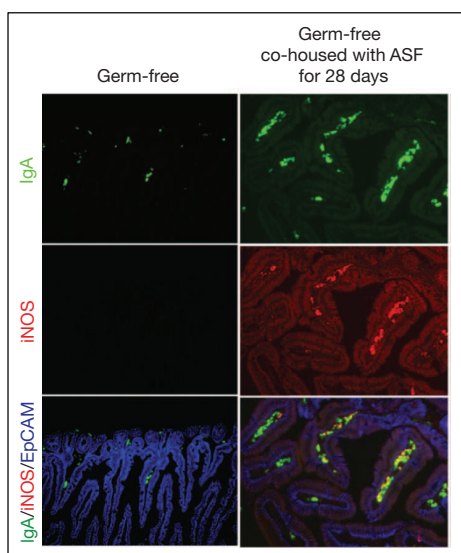


Figure 13. Présence conditionnelle d'une population de PC à IgA exprimant iNOS dans l'intestin.

EpCAM : cellules épithéliales.
(adapté de Fritz et al, 2012)

Un groupe de recherche a également identifié parmi la population de plasmocytes à IgA intestinaux une sous-population capable de sécréter du $\text{TNF-}\alpha$ et d'exprimer l'enzyme iNOS (« *inducible Nitric Oxide Synthase* ») ainsi que plusieurs molécules classiquement associées aux monocytes et aux granulocytes (Fritz et al., 2012). Le $\text{TNF-}\alpha$ et l'iNOS, deux composés dont l'action antimicrobienne est largement décrite, ont également été impliqués dans l'induction de la réponse IgA (Tezuka et al., 2007). Ainsi, les auteurs montrent que l'expression de ces deux composés par les plasmocytes à IgA de l'intestin est dépendante de la colonisation du tube digestif par la flore commensale (**Figure 13**), et qu'une délétion spécifique du $\text{TNF-}\alpha$ et de l'iNOS dans la lignée lymphocytaire B entraîne une baisse de la

production d'IgA, un défaut de diversification de la flore et une sensibilité accrue aux germes pathogènes (action antimicrobienne des deux composés) (**Figure 14d**).

L'ensemble de ces études prouve aujourd'hui que les plasmocytes à IgA ont un rôle majeur dans la régulation des réponses adaptatives dans l'intestin, et qu'un déficit de cette population cellulaire peut engendrer, en plus d'un déficit dans la production de SIgA, des perturbations majeures dans la relation établie entre le système immunitaire de l'hôte et les bactéries qui colonisent l'intestin.

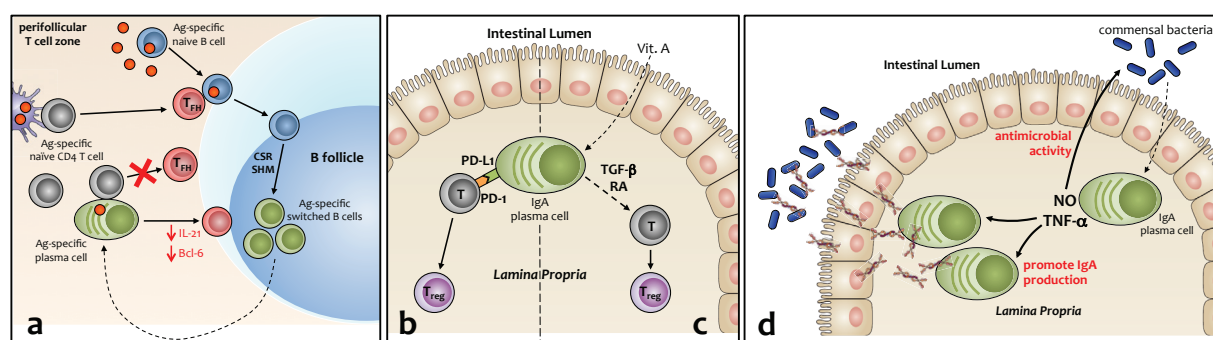


Figure 14. Les plasmocytes jouent différents rôles dans l'immunité en plus de la sécrétion d'anticorps.

(a) Boucle de rétro-contrôle négatif exercé par les plasmocytes au niveau des zones péri-folliculaires, entraînant l'inhibition de la différenciation des lymphocytes T CD4 en T_{FH} via la présentation d'Ag par le PC. (b-c) Participation des plasmocytes à IgA intestinaux dans la différenciation de T_{reg} , (b) via la voie PD-1/PD-L1 ou (c) via la production de facteurs solubles comme le $\text{TGF-}\beta$ et l'acide rétinoïque. (d) Existence d'une population de PC à IgA sécrétant de $\text{TNF-}\alpha$ et d'oxyde nitrique dans l'intestin, ayant la double capacité d'avoir une activité antimicrobienne et de favoriser la production d'IgA dans la muqueuse intestinale.

2.2. LE CYCLE DE LA REPONSE IgA

Le système immunitaire associé aux muqueuses peut être divisé en sites inducteurs, où les antigènes sont échantillonnés constamment et stimulent la réponse immunitaire adaptative, et en sites effecteurs, où les cellules productrices d'IgA vont venir se loger et exercer leurs fonctions. Les lymphocytes activés dans les sites inducteurs vont rejoindre la circulation sanguine systémique via le canal lymphatique thoracique pour ensuite, via l'action de molécules d'adhésion et de chimio-attraction, se relocaliser dans les sites effecteurs du tissu muqueux et terminer leur différenciation.

N.B : La muqueuse intestinale abritant plus de 80% des plasmocytes à IgA de l'organisme et le cycle de la réponse IgA intestinale étant de loin le mieux documenté, nous nous focaliserons principalement sur cet organe dans ce chapitre. Néanmoins, la biologie de la réponse IgA dans les autres sites muqueux sera abordée en fin de partie.

2.2.1. Principaux sites inducteurs

Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés sont clairement reconnus comme les principaux sites inducteurs de la réponse IgA. Néanmoins, sur la base d'approches expérimentales récentes permettant la détection sensible d'AID et des cercles d'excision alpha, il apparaît que d'autres structures soient impliquées dans l'induction de la réponse IgA, comme les ganglions mésentériques ou encore la *Lamina Propria*. Cependant, l'importance de cette dernière pour la réponse IgA globale reste controversée.

- Les plaques de Peyer :

Aujourd'hui, il ne fait plus aucun doute que les plaques de Peyer constituent le principal site inducteur de la réponse IgA. Les travaux pionniers de Craig et Cebra montraient dès les années 70 grâce à des transferts de cellules *in vivo* que les plaques de Peyer constituent une source majeure de précurseurs des plasmocytes à IgA intestinaux (Craig and Cebra, 1971). La position anatomique des plaques de Peyer, en contact direct avec la source d'antigènes, leur structuration caractéristique ainsi que leur composition cellulaire en font un site privilégié pour l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes à IgA. Ils rencontrent leur antigène sous forme libre directement dans le milieu, présenté sous sa forme native par certains phagocytes mononucléés (cellules dendritiques, macrophages), ou encore le capturent au pôle basal des cellules M.

La voie de différenciation TD y est clairement majoritaire, et permet ainsi la génération d'IgA de forte affinité. Il apparaît néanmoins que la voie TI puisse s'y dérouler. En effet, les plaques de Peyer

abritent des sous-populations de cellules dendritiques particulières (phénotype/fonction – cf paragraphe 2.3.1) produisant des facteurs nécessaires aux deux voies de différenciation, et à l'induction de molécules d'écotaxie sur les lymphocytes B activés, permettant leur relocalisation dans les muqueuses une fois leur différenciation effectuée (Agace and Persson, 2012).

- *Les ganglions mésentériques :*

Les ganglions mésentériques (mLN) sont considérés comme la barrière immunologique de l'intestin. Ils drainent la lymphe de l'ensemble de l'intestin grêle et du colon, et reçoivent des antigènes principalement associés aux cellules dendritiques migratoires provenant de l'intestin, et dans une moindre mesure sous forme libre (Pabst and Bernhardt, 2010; Varol et al., 2010). Ces cellules dendritiques sont caractérisées par l'expression de CD11c et CD103 et sont migrent dans les mLN via le récepteur de chimiokines CCR7. Cette sous-population est spécialisée dans l'induction de la différenciation de lymphocytes T naïfs en T_{reg} via l'expression de TGF- β et la production d'acide rétinoïque (Coombes et al., 2007), mécanisme critique pour l'initiation de la tolérance orale (Worbs et al., 2006). Elles ont également été impliquées dans le transport de bactéries commensales vivantes provenant de la lumière intestinale, et induisent ainsi une réponse IgA dans les mLN (Macpherson and Uhr, 2004).

Malgré le fait que, comme dans les plaques de Peyer, les lymphocytes B présents dans les follicules des mLN soient principalement des B-2, plusieurs études *in vitro* proposent que c'est la voie TI qui est majoritaire dans les mLN (Hahn et al., 2010; Tezuka et al., 2011a). Cependant, il n'existe pas d'évidence expérimentale directe permettant de valider ce constat *in vivo*. Enfin, d'une façon complémentaire, les mLN pourraient constituer un site de différenciation des lymphocytes B ayant été activés et subi la commutation isotypique vers IgA dans les plaques de Peyer (Pabst, 2012). En effet, il est connu de longue date que pour rejoindre la circulation systémique, les lymphocytes activés au niveau de l'intestin vont emprunter la voie lymphatique en passant par les mLN, puis le canal thoracique (McWilliams et al., 1977). Ainsi, il a été proposé que les sous-populations de cellules dendritiques et de lymphocytes T puissent influencer la différenciation des plasmablastes à IgA via la production de cytokines comme TGF- β , BAFF ou APRIL.

- *les follicules lymphoïdes isolés :*

Les plaques de Peyer ne sont pas les seules structures lymphoïdes organisées présentes dans la paroi intestinale. Il existe en effet d'autres structures distribuées de façon éparse le long de l'intestin : les follicules lymphoïdes isolés (ILF). Ils sont caractérisés par un fort enrichissement en lymphocytes B (présence de follicules et de centres germinatifs), l'absence de zones T périfolliculaires et la présence d'un épithélium de type FAE comprenant des cellules M (Lorenz and

Newberry, 2004). Il est proposé que les ILF participent à la réponse IgA par la voie TI majoritairement (Pabst, 2012; Tsuji et al., 2008).

Il est impossible à ce jour de déterminer dans quelle mesure la réponse IgA développée dans les ILF participe à la réponse IgA intestinale globale. Il a tout de même été démontré à plusieurs reprises que, chez des souris dont on a volontairement bloqué le développement des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques, une hyperplasie des ILF est observée et permet de maintenir une réponse IgA intestinale proche de la normale (Hashizume et al., 2007; Lorenz and Newberry, 2004; Tsuji et al., 2008). Par ailleurs, les ILF sont responsables de la réponse IgA post natale en l'absence de PP (Lécuyer et al., 2014).

- *La Lamina Propria intestinale :*

L'environnement cellulaire de la *Lamina Propria* intestinale permet de fournir de nombreux facteurs favorables à l'expression d'AID et à la commutation isotypique vers IgA, mais il existe aujourd'hui un débat important sur le fait que ce tissu lymphoïde diffus puisse constituer un site de différenciation de lymphocytes B IgA⁺. En effet, si certains groupes ont réussi à détecter chez la souris des marqueurs moléculaires de la commutation isotypique vers IgA (AID, cercles d'excision alpha...) directement dans la *Lamina propria* (Crouch et al., 2007; Fagarasan et al., 2001), d'autres groupes affirment que l'événement de commutation ne peut avoir lieu en dehors des plaques de Peyer ou des follicules lymphoïdes isolés (Bergqvist et al., 2006; 2010; Shikina et al., 2004). Notons par ailleurs que les lymphocytes B naïfs constituent une population très faiblement représentée au sein de la *Lamina Propria*. De plus chez l'Homme, contrairement à la souris, la majorité des plasmocytes à IgA intestinaux possèdent de multiples mutations dans les chaînes légères alpha, signe du passage des cellules par une réaction du centre germinatif (processus d'hypermutations somatiques) (Pabst, 2012) dans des structures lymphoïdes organisées. Cette observation est confortée par des études montrant qu'il n'est possible de détecter ni l'expression d'AID dans les lymphocytes B issus de *Lamina Propria* intestinale humaine, ni la présence de marqueurs de prolifération (Boursier et al., 2005). Néanmoins, une étude a démontré que suite à la stimulation par des composés bactériens, les cellules épithéliales du colon produisent APRIL, qui va avoir pour effet d'induire une commutation isotypique secondaire d'IgA1 vers IgA2 chez des plasmablastes différenciés, et ce directement dans la *Lamina Propria* (He et al., 2007). Ce procédé permettrait ainsi de favoriser la résistance des IgA aux protéases bactériennes produites en masse dans le colon. De façon évidente, la difficulté expérimentale d'isoler des leucocytes de la *Lamina Propria* sans contamination par des cellules issues de cryptopatches ou d'ILF constitue un des principaux points de discussion dans ce débat (Cerutti, 2008).

2.2.2. La Lamina Propria intestinale : principal site effecteur de la réponse IgA

A la sortie du GALT, les lymphocytes B activés rejoignent la circulation lymphatique et migrent dans un premier temps jusqu'aux ganglions mésentériques. Là, ils poursuivent leur prolifération, acquièrent progressivement un phénotype plasmablastique, et augmentent de leur capacité de sécrétion d'immunoglobulines (Fagarasan and Honjo, 2003). Les plasmablastes empruntent ensuite le canal lymphatique thoracique afin de rejoindre la circulation sanguine centrale (Guy-Grand et al., 1974; McWilliams et al., 1977). Un des mécanismes cruciaux entraînant l'adressage spécifique de ces cellules au niveau de la muqueuse intestinale réside dans l'interaction de

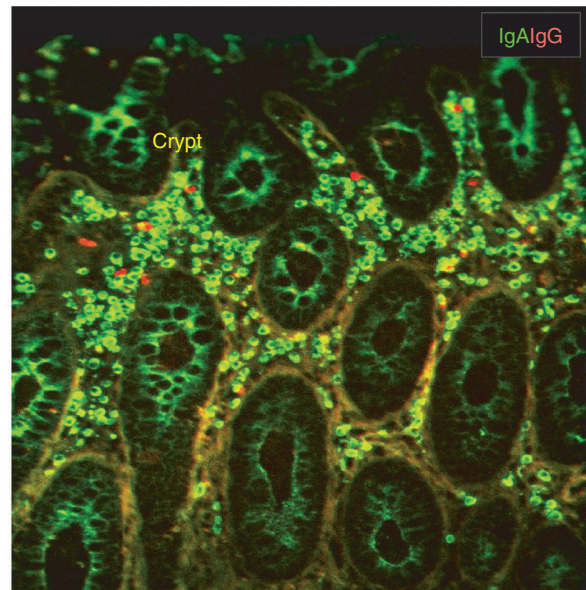


Figure 15. La *Lamina Propria* intestinale abrite un contingent important de plasmocytes à IgA. Marquages immunofluorescents sur coupes de colon humain.
(tiré de Brandtzaeg & Johansen, 2005)

l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$ exprimée par les plasmablastes à IgA avec une molécule d'adhésion MadCAM1 (*Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule 1*) exprimée sur la surface apicale des cellules endothéliales des veinules à épithélium épais (*High Endothelial Venules* – HEV) de l'intestin (Brandtzaeg and Johansen, 2005). Cette interaction va mener à l'extravasation des plasmablastes hors des veinules pour rejoindre le tissu. La migration des cellules jusqu'à la sous-muqueuse dépend ensuite de l'action de facteurs chimiotactiques, dont l'identité varie en fonction du type de muqueuse. Le CCR9, fortement exprimé à la surface des lymphocytes B et T activés dans le GALT (Johansson-Lindbom et al., 2003; Mora et al., 2006), est un facteur déterminant permettant la migration des plasmablastes dans l'intestin grêle. Son ligand, la molécule TECK (*Thymus-Expressed ChemoKine*), ou CCL25, est exprimé par les cellules épithéliales des cryptes de l'intestin grêle (**Figure 16**). L'expression par le plasmablaste de ces molécules de domiciliation est initiée lors de l'activation des lymphocytes B dans le GALT, et dépend de la présence d'acide rétinoïque (Hammerschmidt et al., 2011; Iwata et al., 2004), un dérivé de la vitamine A, fourni essentiellement par certaines sous-populations de cellules dendritiques exprimant l'enzyme RALDH (*RetinALdehyde DeHydrogenase*) (Hammerschmidt et al., 2011; Iwata et al., 2004; Mora et al., 2006).

La domiciliation dans la *Lamina Propria* du colon est elle aussi dépendante d' $\alpha 4 \beta 7$, mais fait intervenir en plus le couple CCL28-CCR10. En effet, les plasmablastes peuvent également exprimer le CCR10, dont le ligand CCL28 (ou MAE -*Mucosae-Associated Chemokine*) est produit en très forte quantité par les cellules épithéliales du colon comparativement à celles du grêle (Hieshima et al.,

2004). La rétention physique des plasmocytes est également assurée par des molécules d'adhésion comme le récepteur de la matrice extracellulaire (CD44), exprimé très fortement par les lymphocytes B dès leur sortie du centre germinatif (Brandtzaeg and Johansen, 2005).

Ensuite, les signaux importants pour la différenciation terminale des plasmablastes en plasmocytes ainsi que pour leur survie (TGF- β , IL-6, IL-10) sont produits principalement par les cellules stromales (Kang et al., 2002), mais également en partie par les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les lymphocytes T ou encore des cellules de l'immunité innée (Cerutti et al., 2012; Chu et al., 2011).

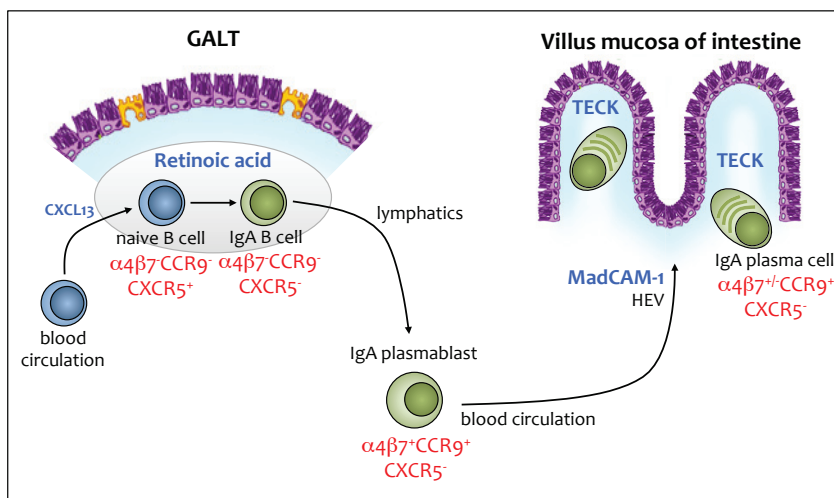


Figure 16. Mécanismes de domiciliation des plasmocytes à IgA dans la muqueuse de l'intestin grêle.

En outre, il est à noter qu'il peut exister des voies alternatives de domiciliation dans la *Lamina Propria* intestinale, notamment une voie directe, où les plasmablastes dans le GALT pourraient emprunter les connexions vasculaires existantes entre les plaques de Peyer et les villosités par exemple, et iraient ainsi se localiser à la périphérie directe de leur lieu d'activation (Crabbé et al., 1970; Mayrhofer and Fisher, 1979; Parrott, 1976).

A ce jour, la durée de vie des plasmocytes à IgA dans l'intestin reste inconnue. Ce point est en effet capital car l'obtention d'une mémoire plasmocytaire dans l'intestin constitue l'objectif principal de la vaccination muqueuse. Dans la moelle osseuse, les niches de survie plasmocytaires sont bien décrites et impliquent plusieurs types cellulaires produisant des facteurs de survie, les principaux étant la chimiokine SDF-1/CXCL12 (récepteur : CXCR4), l'IL-6, BAFF et APRIL (Avery et al., 2003; Belnoue et al., 2008; Chu and Berek, 2013). Dans l'intestin, les cellules de la musculature produisent de l'IL-6 (Ng et al., 2003), les cellules épithéliales produisent également de l'IL-6, mais aussi CXCL12 (Agace et al., 2000), BAFF et APRIL (Huard et al., 2008), et stimulent les cellules dendritiques à produire du BAFF et de l'APRIL via la TSLP (He et al., 2007; Xu et al., 2007). Ainsi, le microenvironnement cytokinique et cellulaire intestinal est compatible avec l'existence d'une niche propice à la survie des plasmocytes.

Pourtant, l'hypothèse proposée le plus communément à l'heure actuelle pour décrire la réponse IgA homéostatique est la suivante : l'activation des lymphocytes B dans le GALT est un processus continu, engendrant ainsi la formation d'un grand nombre de plasmablastes qui vont venir se loger dans la muqueuse intestinale. Donc, dans un scénario de compétition, les plasmocytes à IgA établis dans la *Lamina Propria* seraient perpétuellement remplacés par des plasmablastes nouvellement recrutés. Des études assez récentes montrent néanmoins que les plasmocytes à IgA présentent des caractéristiques intermédiaires entre le plasmocyte effecteur (« short-lived plasma cell ») et le plasmocyte mémoire (« long-lived plasma cell »), sur la base de leur profil d'expression génique (Medina et al., 2003) ainsi que sur leur capacité à maintenir sur une longue durée la sécrétion d'IgA lors de culture *ex vivo* d'explants intestinaux (Mesin et al., 2011). Une étude menée sur un modèle de souris axénique démontre que l'exposition transitoire à une souche de *E.coli* entraîne l'apparition de plasmocytes à IgA dans l'intestin, avec une production d'IgA spécifiques pendant plus de trois mois. Cependant, l'introduction d'une flore commensale plus complète entraîne une diminution de la quantité d'IgA spécifique d'*E.coli* (Hapfelmeier et al., 2010). L'ensemble de ces observations nous permet ainsi de penser que malgré le flux continu de plasmablastes arrivant dans la muqueuse, au moins une partie des plasmocytes à IgA installés dans la *Lamina Propria* a la capacité de survivre pour de longues périodes et de sécréter des IgA spécifiques (Cerutti, 2010).

2.2.3. Les sites alternatifs de la réponse IgA

Il est nécessaire de noter que si l'intestin représente le site majeur de la réponse humorale à IgA, il est possible de détecter des populations de plasmocytes à IgA dans d'autres organes. Tout d'abord, le NALT (*Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue*) et le BALT (*Bronchoalveolar-Associated Lymphoid Tissue*), faisant tous deux partie du système immunitaire associé au tractus respiratoire, abritent de larges contingents de plasmocytes à IgA. La notion de compartimentalisation est similaire à celle de l'intestin : les sites inducteurs sont représentés par les structures lymphoïdes du NALT (amygdales palatines, végétations adénoïdes) et du BALT (ganglions médiastinaux principalement) qui possèdent des structures épithéliales de type FAE comprenant des cellules M ; les sites effecteurs sont les muqueuses associées, à savoir la muqueuse nasale, bronchique, et des glandes exocrines comme les glandes salivaires et lacrymales. Les plasmocytes retrouvés dans ces zones produisent essentiellement des IgA1 dimériques, qui à l'image des IgA intestinales, sont délivrées dans la lumière par transcytose épithéliale et ont un rôle de maintien de la flore commensale buccale et pulmonaire et de lutte contre les infections par des pathogènes (Brandtzaeg and Johansen, 2005).

Les glandes mammaires abritent également un contingent de plasmocytes à IgA, qui ont notamment pour rôle de délivrer des IgA dans le lait maternel, fournissant ainsi au nouveau né une première barrière protectrice intestinale. L'origine de ces plasmocytes a peu été étudiée, mais il a été proposé qu'ils proviennent du GALT (Roux et al., 1977).

Dans la muqueuse génitale féminine, il existe également une production locale d'IgA. Cependant, la nature de l'épithélium vaginal (pluristratifié) n'est pas adaptée à la transcytose des IgA. Ainsi, elles peuvent uniquement atteindre la lumière par diffusion passive, mais étant donné la taille importante des IgA polymériques, il a été proposé que ce soit les IgG (d'une taille bien moins importante car monomériques) qui aient un rôle majeur dans la protection locale.

De plus, à l'homéostasie, plus de la moitié des plasmocytes de la moelle osseuse sécrètent des IgA. Comme évoqué précédemment, il apparaît que ces plasmocytes participent à la production des IgA monomériques retrouvées dans le sang (Crago et al., 1984; Kutteh et al., 1982a), propriété à relier avec leur faible taux de production de pièce J (Brandtzaeg and Johansen, 2005), contrairement aux plasmocytes intestinaux. Une autre différence entre ces plasmocytes et ceux de l'intestin est l'absence d'expression des molécules de domiciliation intestinale $\alpha 4\beta 7$ et CCR9, mais une expression importante de CXCR3 et CXCR4, responsables de leur domiciliation dans les niches de survie médullaires (Hargreaves et al., 2001; Hauser et al., 2002; Zehentmeier et al., 2014). Enfin, il existe également un petit contingent de plasmocytes à IgA dans la rate, dont le phénotype diffère de celui des plasmocytes intestinaux et médullaires, et rappelle plutôt le plasmablaste. Il a été proposé que les lymphocytes B de la zone marginale de la rate, sous l'influence de facteurs sécrétés par les macrophages, les neutrophiles (Puga et al., 2011) ou encore les *innate Lymphoid Cells* (iLC) (Magri et al., 2014), soient les précurseurs de ce contingent splénique, dont le rôle n'est pas défini.

2.3. LES ACTEURS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA REPONSE IgA

Tout au long de ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur les acteurs directs de la réponse IgA, à savoir les lymphocytes B et les plasmocytes. Néanmoins, chacune des étapes de cette réponse (*i.e.* l'activation du lymphocyte B, la commutation isotypique, la domiciliation, la différenciation plasmocytaire et la survie) met en jeu un grand nombre d'autres acteurs cellulaires et moléculaires. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous allons donc évoquer plus en détail quelles sont les principales cellules impliquées dans ces différentes étapes, et par quels mécanismes elles y participent.

2.3.1. Rôle des sous-populations de cellules dendritiques

Il est établi depuis de nombreuses années que les phagocytes mononucléés de l'intestin (cellules dendritiques et macrophages) participent de façon majeure à la mise en place de la réponse IgA intestinale. Dans ce sens, les travaux originaux de *Spalding et al.* démontraient *in vitro* qu'une mixture des lymphocytes T et de cellules dendritiques issue des plaques de Peyer mise en contact avec des lymphocytes B naïfs menait à une production IgA, phénomène abrogé en l'absence de cellules dendritiques (Spalding et al., 1984). Cependant, les sous-populations de phagocytes mononucléés impliquées, ainsi que leur rôle direct dans la mise en place de la réponse IgA commencent à peine à être décryptées.

Deux principaux types de phagocytes mononucléés ont été identifiés dans l'intestin : les macrophages intestinaux (caractérisés par leur expression de CX3CR1) et les cellules dendritiques (dont la population majoritaire exprime CD103). Néanmoins, la dichotomie macrophage/cellule dendritique ne date que des années 2010 et a été le sujet de beaucoup de débats dans la communauté scientifique (Cerovic et al., 2014), notamment du fait que ces cellules partagent l'expression de CD11c et du CMH II, classiquement associés aux cellules dendritiques dites conventionnelles. Les phagocytes mononucléés intestinaux sont localisés directement sous l'épithélium et ont la capacité d'étendre des dendrites entre les cellules épithéliales pour échantillonner directement les antigènes dans la lumière intestinale (Chieppa et al., 2006), ce sans altérer l'étanchéité de l'épithélium grâce à la formation de jonctions serrées au niveau entre les dendrites et les cellules épithéliales adjacentes (Rescigno et al., 2001). Néanmoins, une majeure partie des cellules dendritiques semblent capter principalement les antigènes apportés au niveau des cellules M. Contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques ont la capacité de migrer par voie lymphatique jusqu'aux ganglions mésentériques (Schulz et al., 2009). Cependant, une étude très récente montre que les macrophages ont la capacité de transmettre un antigène qu'ils ont capté aux cellules dendritiques au sein de la muqueuse intestinale, afin que cette dernière puisse rejoindre les ganglions et induire les réponses adéquates (Mazzini et al., 2014). Ensemble, les macrophages et les cellules dendritiques intestinales jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie locale et systémique.

- Les *TipDC* (« *TNF and iNOS producing Dendritic Cells* ») : (Tezuka et al., 2007)

En 2007, un groupe de recherche japonais a identifié une sous-population de cellules dendritiques présente dans la *Lamina Propria* intestinale potentiellement impliquée dans la réponse IgA. En utilisant un modèle de souris transgéniques déficientes pour l'iNOS nécessaire à la production d'oxyde nitrique (NO), ils montrent que la réponse IgA intestinale est fortement diminuée chez ces souris. Ils ont alors identifié une population de cellules dendritiques, qui sous l'effet de la

stimulation des TLR par des ligands bactériens, va produire du NO, du BAFF et de l'APRIL. Le NO a pour effet d'augmenter l'expression du récepteur au TGF- β sur les lymphocytes B. Les auteurs montrent ainsi *in vitro* que les TipDC sont essentielles à la mise en place de la réponse IgA à la fois dans un mode TD (action sur la voie du TGF- β) et TI (action directe de BAFF et APRIL) (**Figure 17a**). Au vu du phénotype de ces cellules et des connaissances actuelles sur les caractéristiques phénotypiques respectives des cellules dendritiques et des macrophages intestinaux, il apparaît que ces cellules soient plus vraisemblablement des macrophages (CMHII⁺CD11b⁺CD11c^{low} Ly6C⁺Gr1⁺Mac3⁺).

- Les cellules dendritiques conventionnelles de l'intestin :

Un an plus tard, une seconde équipe japonaise a démontré qu'une sous-population majoritaire de cellules dendritiques conventionnelles de l'intestin (CD11c⁺⁺CD11b⁺CD103⁺) exprimant TLR5 produit de l'acide rétinoïque et de l'IL-6 en réponse à une stimulation par la flagelline (constituant du flagelle bactérien, principal ligand de TLR5). Cette capacité va permettre de favoriser l'activation et la différenciation de plasmocytes à IgA (**Figure 17b**), et d'induire l'expression de molécules nécessaires à leur domiciliation intestinale (Uematsu et al., 2008). En effet, le rôle de l'acide rétinoïque dans la modulation de ce type de molécules avait déjà été proposé deux ans auparavant, sans pour autant définir précisément la population de cellules dendritiques impliquée (Mora et al., 2006).

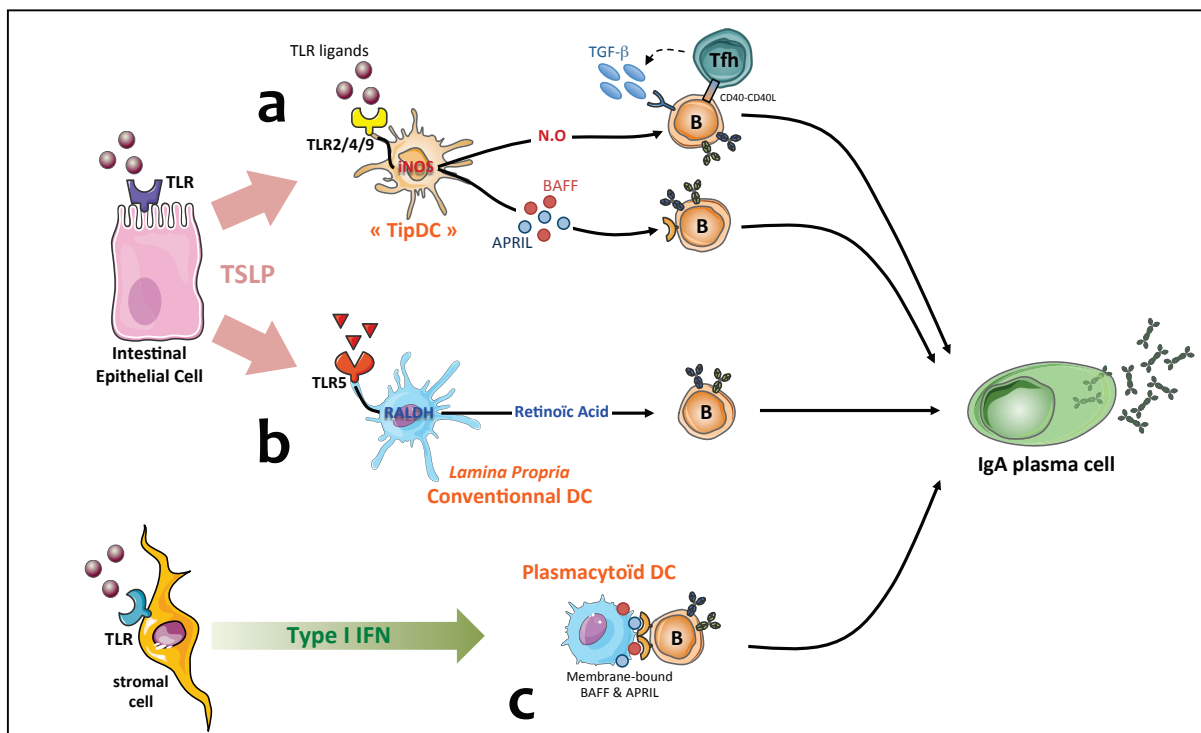


Figure 17. Différentes sous-populations de cellules dendritiques participent à la mise en place de la réponse IgA.

Par ailleurs, une étude réalisée grâce à une lignée de souris transgénique (CD11c-DTR) permettant l'ablation sélective de cellules dendritiques a permis de montrer dans un modèle de vaccination par voie muqueuse, que la mise en place de la réponse T auxiliaire spécifique de l'antigène ainsi que la réponse IgA sont fortement altérées en l'absence de cellules dendritiques (Fahlén-Yrlid et al., 2009). Ces résultats proposent que les cellules dendritiques conventionnelles intestinales constituent un élément majeur de prise en charge de l'antigène vaccinal, permettant ensuite d'activer efficacement les réponses protectrices spécifiques dans un mode TD.

- *les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) intestinales :*

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes forment une population cellulaire distincte des macrophages et des cellules dendritiques conventionnelles, et représentent la principale population de cellules dendritiques circulantes. Ainsi, contrairement aux cellules dendritiques conventionnelles qui rejoignent les organes lymphoïdes par voie lymphatique, les pDC arrivent dans les ganglions et la rate par les vaisseaux sanguins. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques propres, et sont connues pour leur forte capacité de sécrétion d'interféron de type 1 en réponse aux infections virales (via TLR7 et TLR9). Néanmoins, il a fallu attendre 2006 et 2007 pour que cette population soit identifiée dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques (Yrlid et al., 2006) et dans la muqueuse intestinale (Wendland et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que ces pDC n'ont pas la capacité de migrer par la voie lymphatique de la muqueuse vers les ganglions mésentériques (Yrlid et al., 2006).

En 2011, le même groupe de recherche ayant décrit le rôle des TipDC dans la réponse IgA publie une étude dans laquelle ils démontrent que les pDC issues du GALT ont une forte capacité à induire la commutation isotypique vers IgA *in vitro* par la voie TI, comparativement aux cellules dendritiques conventionnelles de l'intestin, et aux pDC issues de structures lymphoïdes périphériques. Cette capacité est liée à l'expression de BAFF et d'APRIL en membrane. En effet, si BAFF et APRIL sont généralement sécrétés dans le milieu, les auteurs montrent ici que le contact cellulaire entre la pDC et le lymphocyte B semble nécessaire (Tezuka et al., 2011b). Ils montrent ensuite que cette production est dépendante de la stimulation par de l'interféron de type 1 sécrété par les cellules stromales (**Figure 17c**). Ces résultats ayant été uniquement obtenus *in vitro*, le rôle précis des pDC dans cette réponse reste à déterminer clairement *in vivo*.

Une équipe a proposé très récemment une implication des pDC dans la réponse IgA contre le rotavirus, un pathogène intestinal très étudié. En effet, les auteurs montrent qu'une déplétion *in vivo* des pDC résulte en une altération partielle de la production d'IgA spécifiques dans l'intestin, via un mécanisme dépendant de la production directe d'IFN de type 1 par les pDC (Deal et al., 2013). Comme déjà évoqué, si les pDC sont reconnues comme étant de très bonnes répondeuses

aux infections virale, la grande majorité des antigènes intestinaux endogènes (principalement représentés par les bactéries de la flore commensale) sont considérés comme non-infectieux, et ne sont pas connus pour activer les pDC. Ainsi, le rôle des pDC dans la réponse IgA homéostatique dirigée contre ces antigènes reste encore à élucider.

2.3.2. D'autres types cellulaires, d'origine hématopoïétique ou non, sont impliqués dans la réponse IgA

Le microenvironnement intestinal abrite une diversité cellulaire considérable, et il apparaît de plus en plus évident qu'il existe de fortes redondances dans l'induction de la réponse IgA. Dans ce sens, de nombreux acteurs sont aujourd'hui connus pour participer à la réponse IgA, directement ou indirectement.

- les lymphocytes T régulateurs :

Les lymphocytes T régulateurs sont des acteurs majeurs dans le maintien de l'homéostasie intestinale, via leur rôle de suppression des réponses T pro-inflammatoires contre les antigènes intestinaux. Il apparaît néanmoins de plus en plus évident qu'ils jouent également un rôle majeur dans la mise en place de la réponse IgA. Les T_{reg} sont d'importants producteurs de TGF- β , dont nous avons également déjà évoqué le rôle majeur dans l'induction de la commutation isotypique vers IgA dans la voie TD. Par ailleurs, une équipe de recherche a démontré que les T_{reg} représentent une population importante de précurseurs de T_{FH} dans les plaques de Peyer, et favorisent la mise en place de réactions du centre germinatif résultant en la différenciation de plasmablastes à IgA (Tsuji et al., 2009). Très récemment, cette même équipe a publié une étude remarquable décrivant que les T_{reg} peuvent également se différencier en lymphocyte T_{FR} (*T follicular regulatory*), qui exercent un rôle de sélection des lymphocytes B à IgA du centre germinatif des plaques de Peyer. Ils proposent alors que cette sélection ait une influence directe sur le maintien de la diversité de la flore commensale intestinale (Kawamoto et al., 2014). Enfin, une étude montre que la déplétion pendant quelques jours *in vivo* des lymphocytes T_{reg} avec un anticorps anti-CD25 entraîne une baisse considérable de la quantité de SIgA dans la lumière intestinale et du contingent plasmocytaire de l'intestin. Ceci suggère que les T_{reg}, outre leur rôle dans l'initiation de la réponse IgA, joueraient un rôle dans la rétention/survie des plasmocytes à IgA de la *Lamina Propria* (Cong et al., 2009).

- Les cellules épithéliales intestinales :

La position de ces cellules entre un environnement riche en antigènes et une zone peuplée de nombreuses cellules immunitaires en fait des acteurs majeurs de la régulation de la réponse immunitaire. Ainsi, la stimulation apicale des cellules épithéliales par des ligands bactériens de TLR

induit la production de nombreux facteurs favorables à la réponse IgA. Il a notamment été décrit qu'elles produisent du TGF- β et de l'IL-10, tous deux favorisant la commutation isotypique vers IgA. Elles produisent également BAFF et APRIL qui contribuent à la fois à l'induction de la différenciation et à la survie des plasmocytes. Enfin, via la sécrétion de TSLP, elles « éduquent » les cellules dendritiques intestinales à adopter un phénotype pro-IgA, en incitant notamment leur production de BAFF, APRIL, IL-10 et d'oxyde nitrique (He et al., 2007; Shang et al., 2008; Xu et al., 2007). Par ailleurs, nous avons déjà évoqué le rôle des cellules épithéliales du colon dans une commutation isotypique locale des plasmocytes à IgA1 vers IgA2 (He et al., 2007).

- *les cellules dendritiques folliculaires :*

Les centres germinatifs des organes lymphoïdes abritent un réseau de cellules dendritiques folliculaires dont le rôle est de capturer et de présenter les antigènes sous forme d'immuns complexes via leur FcR. Malgré leur nom de « cellules dendritiques », celles-ci ont des caractéristiques phénotypiques et ontogéniques complètement différentes des cellules dendritiques à proprement parler. En effet, i) leur origine n'est pas hématopoïétique mais mésenchymateuse et ii) elles permettent la sélection de clones de lymphocytes B spécifiques directement au niveau du follicule (Shikh et al., 2009). Les cellules dendritiques folliculaires présentes dans les plaques de Peyer et dans les ganglions mésentériques ont la particularité de produire du TGF- β , du BAFF et de l'APRIL en réponse à la stimulation de TLR (Suzuki et al., 2010). Ainsi, elles fournissent directement dans le follicule B et le centre germinatif les facteurs favorisant l'initiation de la réponse IgA.

Par ailleurs, de nombreuses études très récentes proposent que d'autres types cellulaires soient également impliqués dans la réponse IgA, via la production de TGF- β , de CD40L, de BAFF, d'APRIL, et d'autres molécules dont le rôle a été évoqué précédemment. Nous citerons principalement les LTi (*Lymphoid Tissue inducers cells* - (Tsuji et al., 2008), les lymphocytes T_{H17} (Hirota et al., 2013), les neutrophiles (Puga et al., 2011), les NKT (*Natural Killer-T cells*), mais également les éosinophiles (Chu et al., 2011; 2014), les basophiles ou encore les mastocytes (Cerutti et al., 2012; Tsuji et al., 2008). Néanmoins, le rôle respectif de ces types cellulaires reste à préciser.

3. CHAPITRE 3

L'AXE INTESTIN-FOIE

3.1. L'ANATOMIE DU FOIE EST ADAPTEE A SA FONCTION

3.1.1. Anatomie et physiologie générale du foie

Le foie est un organe majeur de la cavité abdominale, situé au niveau de l'hypochondre droit, et représentant jusqu'à 5% du poids corporel. De par sa localisation centrale, il remplit un rôle fondamental dans de nombreux métabolismes intermédiaires.

Le foie dispose d'un système circulatoire dense, complexe et spécifique, qui lui permet d'exercer de multiples fonctions exocrines et endocrines. Le flux sanguin le traversant représente environ 25% du flux cardiaque sortant. La particularité du foie est de présenter une double afférence sanguine : il draine le sang veineux provenant du tube digestif, de la rate et du pancréas via la veine porte (assurant 3/4 de la perfusion de l'organe), en plus d'un apport en sang artériel arrivant via l'artère hépatique (**Figure 18**).

Le foie possède une structure anatomique polylobée (le nombre de lobes varie selon l'espèce). Chacun des lobes est bordé d'une tunique séreuse reposant sur une fine capsule conjonctive, dont l'extension en minces cloisons à l'intérieur de l'organe permet de diviser le parenchyme hépatique en une infinité de sous-unités structurales : les

lobules. Les lobules hépatiques ont une structure polygonale, et sont constitués d'un parenchyme organisé formant des travées hépatocytaires, convergeant vers le centre du lobule. Ce sont dans ces travées que la veine porte et l'artère hépatique vont converger et former les capillaires sinusoides (**Figure 19**), dans lesquels le flux sanguin est fortement ralenti du fait de leur diamètre réduit (MacPhee et al., 1995). Ce ralentissement ainsi que la présence de pores caractéristiques dans l'endothélium permet des échanges importants entre les composés présents dans le flux sanguin et les hépatocytes, qui constituent la majorité du parenchyme.

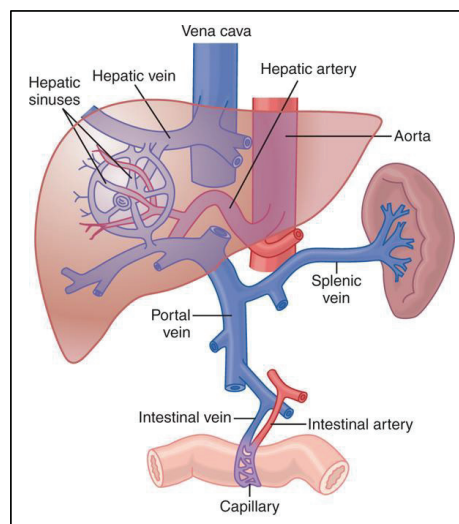


Figure 18. La double afférence sanguine du foie.

Le sang arrive dans le foie par la veine porte et l'artère hépatique, qui se divisent en une multitude de ramifications dans le parenchyme, puis convergent ensuite pour donner les veines sus-hépatiques, puis la veine cave.

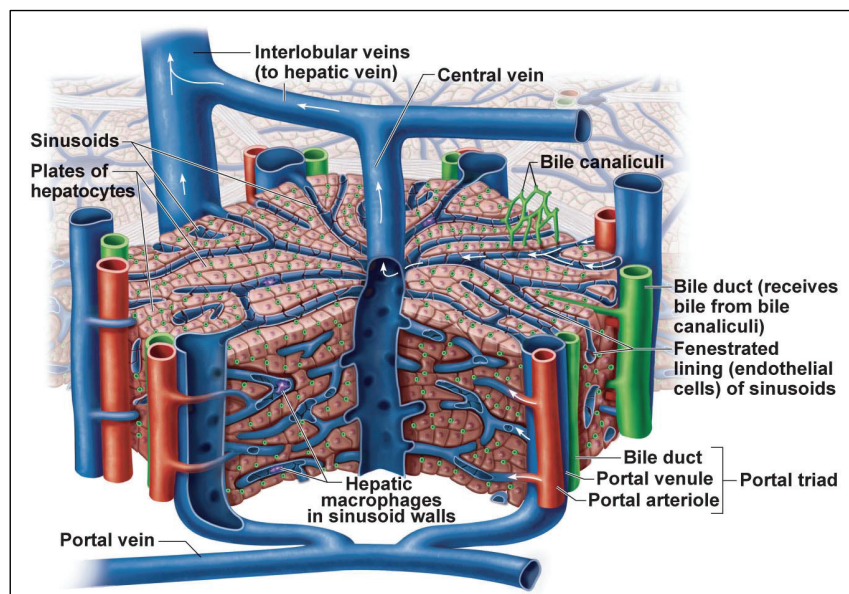
(source : www.anatomybodyblog.com)

Les hépatocytes sont doués de capacités biochimiques multiples leur permettant d'assurer les fonctions métaboliques du foie. Ils exercent une fonction dans le métabolisme i) du glucose (stockage du glucose sanguin sous forme de glycogène, puis dégradation pour relarguer du glucose dans le sang), ii) des lipides (oxydation des acides gras, stockage de lipides, synthèse de cholestérol), iii) des protéines (synthèse d'albumine, de globulines, de fibrinogène...), mais également dans le stockage d'autres composés comme le fer, le cuivre, la vitamine A... La deuxième grande fonction de l'hépatocyte est la production de bile, une sécrétion exocrine contenant à la fois des produits d'élimination (composés toxiques dégradés provenant du sang, sous forme de pigments biliaires ou bilirubine) et des substances à action digestive (sels biliaires). La bile est acheminée via de fins canalicules biliaires formés entre les hépatocytes. Le réseau canaliculaire est drainé en périphérie du lobule jusqu'aux canaux biliaires interlobulaires, qui eux mêmes convergent vers le canal cholédoque jusqu'à la vésicule biliaire.

Figure 19. Organisation du lobule hépatique.

Le sang veineux et artériel se déverse dans les sinusoides hépatiques situés entre les travées hépatocytaires et rejoint la veine centrolobulaire.

(source : www.anatomybodyblog.com)



3.1.2. Structure micro-anatomique des sous-unités hépatiques

Le lobule hépatique correspond à l'unité morphologique et fonctionnelle du foie, dont la structure parenchymateuse complexe est dictée principalement par sa vascularisation. Le lobule se divise en quatre sous-compartiments micro-anatomiques caractéristiques :

- *l'espace porte :*

Les ramifications les plus volumineuses de la veine porte, de l'artère hépatique et des canaux biliaires sont situées dans des espaces conjonctifs qui séparent trois lobules voisins. Ces zones constituent les espaces porte (ou canal portal), dans lesquels les trois conduits principaux forment

la triade hépatique (**Figure 20**). Chacun de ces conduits émet (veine porte et artère hépatique) ou reçoit (canaux biliaires) de fines divisions périlobulaires (qui forment un réseau entre les lobules) et intralobulaires (capillaires sinusoides et canalicules biliaires).

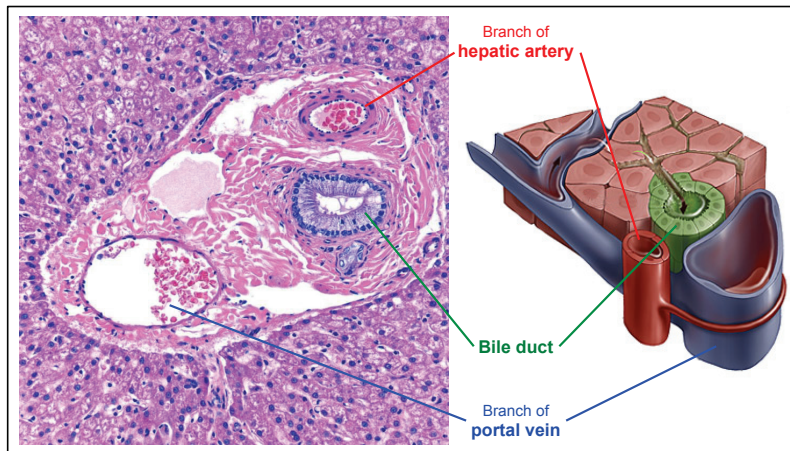


Figure 20. L'espace porte.

L'espace porte est caractérisé par la triade hépatique, correspondant à la ramification des 3 canaux majeurs du foie (veine porte, artère hépatique et canal biliaire).

(adapté du site John Hopkins Medicine – Gastroenterology & hepatology)

- les sinusoides :

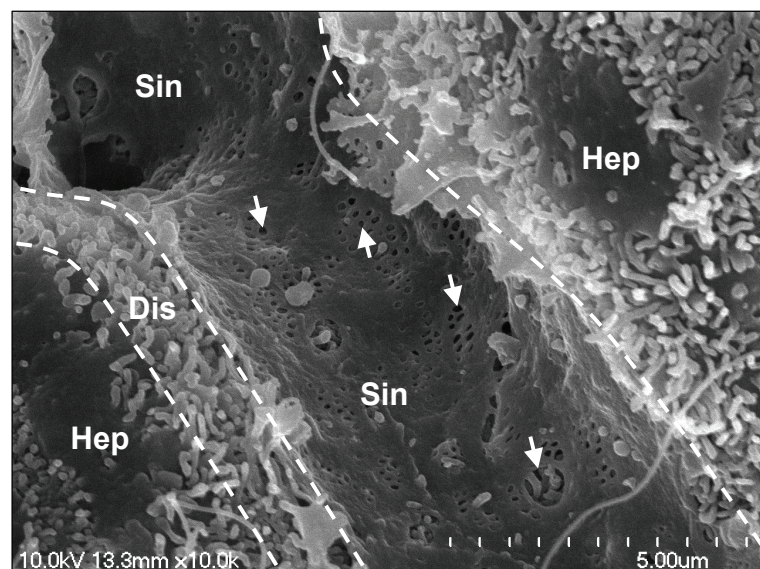
Les capillaires sinusoides constituent le réseau secondaire du système porte hépatique. Ils débutent en périphérie des espaces portes et convergent vers la veine centrolobulaire, qui les draine. Leur faible diamètre (entre 15 et 20 μm) entraînant une forte diminution du flux sanguin, ainsi que leur paroi fenêtrée permettent d'optimiser les échanges moléculaires entre le plasma sanguin et les hépatocytes. En effet, la paroi des sinusoides est constituée de cellules caractéristiques présentant des pores au niveau de leurs extensions cytoplasmiques (**Figure 21**) : les cellules endothéliales sinusoidales du foie (*Liver Sinusoidal Endothelial Cells – LSEC*).

Figure 21. La fenestration des capillaires sinusoides hépatiques.

Observation par microscopie électronique à balayage d'un capillaire sinusoides, montrant les pores formés dans les extensions cytoplasmiques des LSEC, et l'extension de protrusions hépatocytaires par ces pores.

Hep : hépatocytes
Sin : sinusoides
Dis : espace de Disse
Flèches : pores

(adapté du site www.documentingreality.com)



Les LSEC ont par ailleurs des propriétés phénotypiques uniques qui les différencient des cellules endothéliales classiques (Knolle and Limmer, 2003), et vont pouvoir engager des interactions privilégiées avec les leucocytes véhiculés par le sang. Enfin, on va retrouver dans les sinusoides une

importante population de macrophages résidants dans le foie : les cellules de Kupffer. Ces phagocytes patrouillent à la surface des LSEC et jouent de multiples rôles de protection et de détoxification, que nous évoquerons dans la partie suivante.

- *l'espace périsinusoïdal ou espace de Disse :*

L'espace de Disse correspond aux étroits interstices existants entre l'endothélium des capillaires sinusoides et la surface des hépatocytes, qui arborent une surface en brosse. Ainsi, les protrusions membranaires des hépatocytes peuvent atteindre directement la lumière du sinusoides via la fenestration de l'endothélium (**Figure 21**).

L'espace de Disse abrite une population cellulaire particulière, les cellules de Ito, ou cellules étoilées, d'origine mésenchymateuse (Baba et al., 2004; Geerts, 2004). Ces cellules se caractérisent par leur capacité de stockage des acides gras sous forme de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques, et constituent la source majeure de vitamine A (rétinol) dans l'organisme (jusqu'à 80% du rétinol est stocké dans ces cellules) (Geerts, 2001).

Les cellules de Ito sont maintenues dans un état quiescent, mais peuvent être activées dans diverses situations de lésions hépatiques. Leur activation entraîne leur différenciation en myofibroblastes responsables de la formation de fibrose hépatique en conditions pathologiques (Friedman, 2000).

- *les voies biliaires :*

L'excrétion de la bile est polarisée au niveau d'étroites cavités ménagées entre les parois des hépatocytes connexes. Ces cavités forment les canalicules biliaires dépourvus de paroi propre, mais qui grâce aux microvillosités formées par les hépatocytes vont acheminer la bile jusqu'à la périphérie des travées hépatocytaires pour converger dans les canaux biliaires des espaces portes. Ainsi, contrairement à la circulation sanguine provenant de la veine porte et de l'artère hépatique qui suivent une trajectoire centripète dans le lobule (espace porte > veine centrolobulaire), la bile s'écoule de façon centrifuge (travées d'hépatocytes > espace porte).

3.1.3. L'axe entéro-hépatique et la détoxification des endotoxines d'origine intestinale

L'axe entéro-hépatique (ou axe intestin-foie) constitue la base anatomique de notre capacité à absorber les nutriments (intestin), les métaboliser et les stocker (foie). Néanmoins, cet axe nécessite la mise en place d'un contrôle immunologique particulier permettant à la fois d'éviter la mise en place de réponses immunitaires envers les antigènes alimentaires (cf paragraphe 3.3.2), tout en maintenant une protection envers les pathogènes. En particulier, le drainage par la veine porte de composés bactériens, dont certains sont toxiques (Jirillo et al., 2002), nécessite la mise en place de

mécanismes d'élimination. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des endotoxines qui composent la paroi des bactéries Gram négatives et sont retrouvés en quantité importante dans la circulation porte. Il a été démontré de longue date que le sang portal est détoxifié dans le foie, entraînant une diminution majeure de la quantité de LPS dans le sang veineux rejoignant la circulation systémique (Zlydaszyk and Moon, 1976). Le foie est d'ailleurs aujourd'hui considéré comme le principal acteur dans la clairance de cette endotoxine.

Différents types cellulaires ont été impliqués dans ce mécanisme de détoxification du LPS. Néanmoins, l'ensemble des recherches portant sur ce sujet démontre que les cellules de Kupffer ont un rôle déterminant dans ce phénomène. Les cellules de Kupffer expriment le Toll-Like Receptor 4 (TLR4), qui est le principal récepteur du LPS, ainsi que le CD14 (marqueur commun des monocytes-macrophages chez l'homme) qui en est le co-récepteur (Feng et al., 2003; Miyake and Yamamoto, 2013). Il a été montré que le LPS arrivant via la veine porte est capté par les cellules de Kupffer au niveau des sinusoides hépatiques, et grâce à l'action d'une lipase endogène (Shao et al., 2007), il va être rendu non-inflammatoire avant d'être relargué dans le milieu (Fox et al., 1989; Treon et al., 1993). Le LPS alors libéré possède en plus une capacité de liaison accrue aux hépatocytes et n'engendre pas de production de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α) par l'hépatocyte contrairement au LPS natif (Treon et al., 1993). Ainsi, les hépatocytes vont pouvoir capter ce LPS dégradé et procéder à son élimination par les voies biliaires (Mimura et al., 1995) sans induire de réponse pro-inflammatoire (**Figure 22**).

Diverses pathologies (cirrhose alcoolique, hépatites virales chroniques, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, hépatites auto-immunes,...) peuvent entraîner une dysbiose profonde (changement majeur de la composition de la flore commensale) et/ou une augmentation de la perméabilité intestinale, occasionnant une translocation accrue de composés bactériens, voire de bactéries vivantes dans la circulation porte (Szabo et al., 2010). Ces composés vont alors pénétrer de façon massive dans le foie, entraînant une forte stimulation des cellules de Kupffer menant à la production de signaux pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β ou encore l'IL-6 (Bala et al., 2011; Medvedev et al., 2002). Par ailleurs, l'intégralité des composés microbiens comme le LPS ne peut pas être pris en charge par les cellules de Kupffer, et vont donc interagir avec les hépatocytes sous leur forme native pro-inflammatoire (Nolan, 1989). Ainsi, l'activation générale des signaux pro-inflammatoires par ces composés issus du tube digestif va engendrer une défaillance hépatique, voire une destruction tissulaire profonde (Lin et al., 2012; Son et al., 2010). Dans cette situation, le foie, aujourd'hui clairement identifié comme la principale barrière vasculaire empêchant la pénétration des micro-organismes dans la circulation systémique (Balmer et al., 2014), ne peut plus jouer efficacement son rôle de détoxification. La pénétration d'endotoxines bactériennes ou encore de bactéries vivantes dans la circulation périphérique peut engendrer une activation du

système immunitaire délétère, participant grandement à la morbidité de ces pathologies. Chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présentant une perméabilité intestinale accrue, il a été montré que le virus infecte les cellules de Kupffer et entraîne leur disparition. Cela a pour effet d'augmenter la translocation de composés bactériens dans la circulation sanguine, créant une pathologie inflammatoire chronique. Un traitement anti-rétroviral adapté permet de rétablir la population de cellules de Kupffer, et diminue le taux d'endotoxines présentes dans le sang (Balagopal et al., 2009; Brenchley et al., 2006).

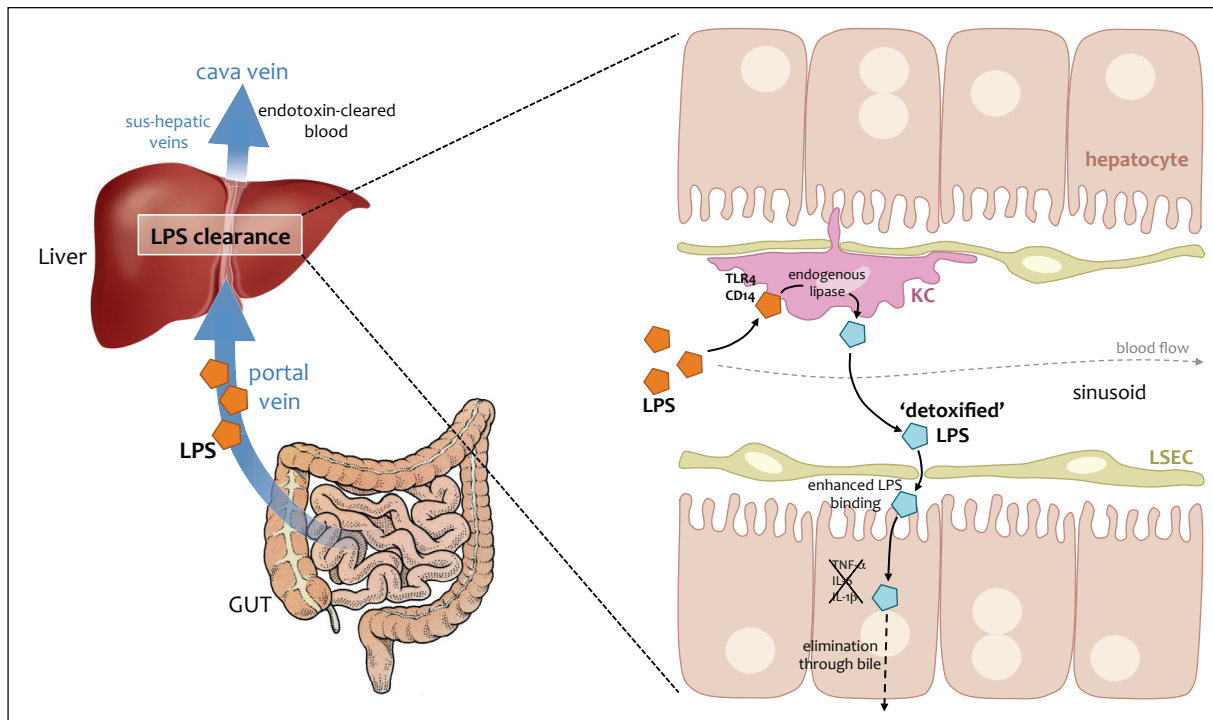


Figure 22. Mécanisme de clairance hépatique des endotoxines d'origine intestinale en conditions normales.

Les endotoxines bactériennes (LPS) traversant la barrière épithéliale intestinale et pénétrant dans la circulation porte doivent être éliminées dans le foie pour éviter une sur-activation du système immunitaire dans les voies systémiques. Les cellules de Kupffer jouent un rôle majeur dans ce processus de clairance en captant le LPS, en le modifiant en une forme non pro-inflammatoire et plus facilement captable par les hépatocytes, qui l'élimineront par les voies biliaires. Ainsi, le sang qui ressort du foie est nettoyé de toute endotoxine.

3.2. LE FOIE : UN ORGANE LYMPHOÏDE ?

La prise en charge des antigènes arrivant dans le foie doit être réalisée de façon rapide et adaptée afin de maintenir l'équilibre immunitaire local et systémique. Comme discuté, les cellules de Kupffer jouent un rôle majeur dans la prise en charge de ces antigènes. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, plusieurs équipes de recherches se sont penchées plus en détail sur la caractérisation et le rôle des autres populations de cellules immunitaires abritées dans le foie. Il a été dorénavant clairement démontré que le foie possède un infiltrat leucocytaire propre (Norris et

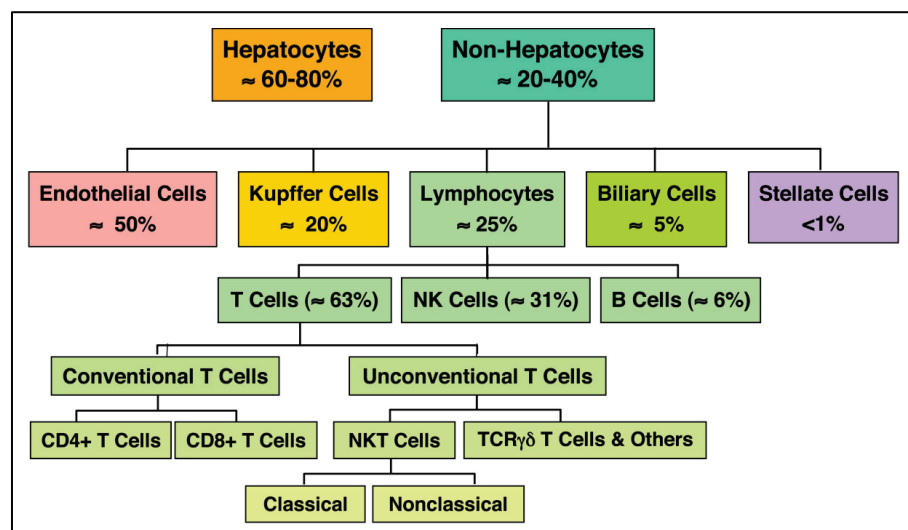
al., 1998) et adapté à la nature des antigènes arrivant dans le tissu hépatique, différant en terme de composition des populations immunitaires du sang et des organes lymphoïdes, valant à cet organe d'être régulièrement considéré comme un organe lymphoïde à part entière.

3.2.1. L'infiltrat lymphocytaire hépatique

Les hépatocytes ne représentent que deux tiers de la population cellulaire totale du foie. Le dernier tiers comprend les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules épithéliales des voies biliaires, les cellules de Kupffer et les lymphocytes intra-hépatiques (**Figure 23**). Si les cellules de Kupffer sont majoritairement présentes au niveau des sinusoides, les lymphocytes intra-hépatiques sont distribués à la fois de façon diffuse dans les sinusoides, mais également regroupés au niveau des espaces portes. Chez l'Homme, cette population lymphocytaire représente environ dix milliards de cellules, dans laquelle on va retrouver des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée et adaptative (Racanelli and Rehermann, 2006).

Figure 23. Composition cellulaire du foie humain sain.

(tiré de Racanelli et al, 2006)



Les lymphocytes intra-hépatiques sont principalement représentés par les lymphocytes T conventionnels et les NKT. Le foie contient également des NK, des lymphocytes B et différentes sous-populations de cellules dendritiques (Racanelli and Rehermann, 2006), ce qui en fait un organe riche en populations immunitaires variées, comprenant des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules effectrices (**Figure 24**).

Contrairement à leur distribution dans le sang, les lymphocytes T CD8 sont plus nombreux que les T CD4 dans le foie, et expriment préférentiellement l'homodimère CD8αα (CD8αβ est quand à lui préférentiellement exprimé par les T CD8 dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires). Le foie contient également une population significative de lymphocytes T double positifs CD4⁺CD8⁺,

dont le rôle n'a pas été défini. Enfin, de façon caractéristique, en moyenne 15% des lymphocytes T du foie expriment le TCR $\gamma\delta$, contre moins de 4% des lymphocytes T de la circulation sanguine (Norris et al., 1998).

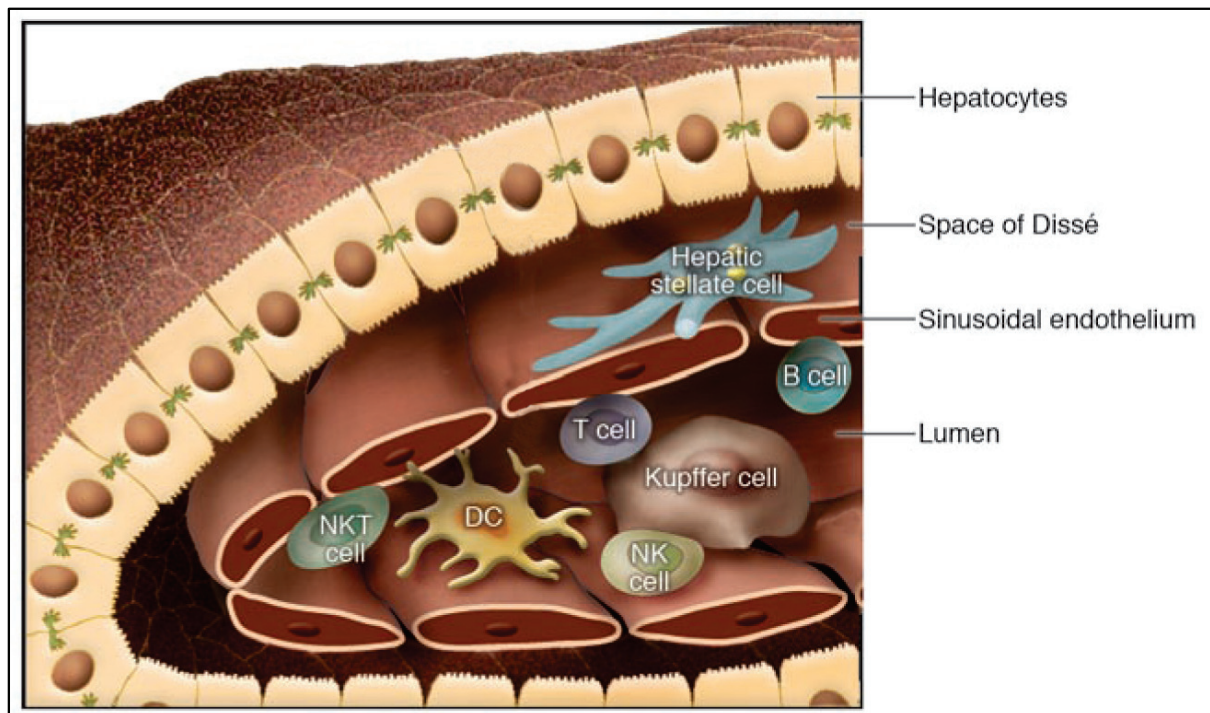


Figure 24. Proximité des différents types cellulaires dans les sinusioïdes hépatiques.

Les sinusioïdes hépatiques, constitués par le parenchyme d'hépatocytes et recouvert par les cellules endothéliales sinusoidales, abritent une grande diversité de cellules immunitaires, résidentes du foie ou non. (adapté de Shoelson et al, 2006)

Les NKT sont des lymphocytes T non-conventionnels exprimant CD3 et des marqueurs de NK, représentant en moyenne 30-40% des cellules CD3⁺ hépatiques chez l'Homme et la souris. Ils possèdent un TCR invariant reconnaissant des glycolipides principalement d'origine bactérienne présentés par le CD1d, une molécule analogue au CMH de type I (Kronenberg and Gapin, 2002). Les NKT sont caractérisés par leur forte capacité à produire de manière rapide des cytokines, pouvant jouer un rôle aussi bien dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale, que dans la régulation de la réponse immunitaire (Crispe, 2003). Dans le foie, les NKT ont été impliqués dans la résistance aux infections bactériennes (Behar et al., 1999), virales (Kakimi et al., 2000), et dans la lutte contre le développement tumoral (Cui et al., 1997).

La proportion de lymphocytes NK est également triplée dans le foie par rapport au sang (Norris et al., 1998). Ces cellules constituent une des premières populations décrites de lymphocytes intra-hépatiques (« pit cells ») et dont les caractéristiques sont leur grande taille, leur forte granularité et leur activité cytotoxique (Bouwens et al., 1987). Aujourd'hui, il a été démontré que la fréquence des

NK hépatiques est fortement augmentée en contexte d'infection virale du foie (McIntyre and Welsh, 1986). De plus, une étude a montré que dans le contexte d'une hépatite virale, les NK jouent un rôle majeur dans l'activation de la réponse T cytotoxique responsable de la lyse des hépatocytes infectés, en particulier via la production d'IFN- γ (Liu et al., 2000; Toyabe et al., 1997).

A l'inverse, la fréquence de lymphocyte B dans le foie est inférieure à celle du sang, atteignant au maximum 5 à 6% chez l'Homme (Racanelli and Rehermann, 2006), tandis que cette population est bien plus abondante chez la souris (jusqu'à 25% des leucocytes – données personnelles). A l'heure actuelle, peu de chose est connu sur cette population de lymphocytes B, ni sur le plan phénotypique, ni sur le plan fonctionnel. Leur faible proportion couplée à la difficulté d'isoler les cellules immunitaires du foie en sont les principales causes. Une seule étude a été publiée chez la souris et montre qu'en réponse à une stimulation *in vitro* par du LPS, les lymphocytes B hépatiques sécrètent moins d'IL-10 que des lymphocytes B de la rate, et ont un pouvoir immuno-stimulateur sur les cellules dendritiques du foie plus important (Zhang et al., 2013). Néanmoins, cette étude ne présente qu'une caractérisation partielle des populations de lymphocytes B du foie chez la souris, et l'ensemble des observations est réalisé *in vitro*.

En contexte infectieux, la répartition des leucocytes hépatique est généralement perturbée, avec notamment une accumulation de lymphocytes NK et T effecteurs, et souvent l'apparition de structures lymphoïdes tertiaires (cf paragraphe 3.3.3). Ces structures, préférentiellement localisées dans les espaces portes, sont constituées d'amas de lymphocytes T et B et contiennent également des cellules présentatrices d'antigène et des cellules dendritiques folliculaires (Racanelli and Rehermann, 2006). Chez les patients porteurs chroniques d'hépatite C, il est fréquent de retrouver des structures semblables à des centres germinatifs au sein de ces follicules lymphoïdes intraportaux, sièges d'une réponse B fonctionnelle (Murakami et al., 1999).

3.2.2. Les cellules présentatrices d'antigènes hépatiques

La présentation d'antigène aux lymphocytes T constitue un mécanisme indispensable dans la mise en place des réponses immunitaires adaptatives. Une multitude de cellules présentatrices d'antigènes existe dans le foie et permet de prendre en charge la quantité importante d'antigènes dérivés de l'intestin et de la circulation sanguine systémique.

- les cellules dendritiques hépatiques :

Le foie contient une quantité importante de cellules dendritiques (DC) interstitielles, localisées préférentiellement dans les espaces portes (Prickett et al., 1988), et comprenant des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC). Néanmoins, leur caractérisation est très

récente et pratiquement exclusivement menée chez la souris (il est très difficile d'obtenir du foie humain frais et sain). Ainsi, chez la souris, les pDC sont fortement enrichies dans le foie et constituent la population de cellules dendritiques majoritaire (20-30%) (Goubier et al., 2008; Jomantaite et al., 2004; Lian et al., 2003; Pillarisetty et al., 2004). On peut ensuite distinguer les mêmes sous-populations que dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate : les DC CD11c⁺CD11b⁺CD8a⁻ et CD11c⁺CD11b⁻CD8a⁺, bien que leur distribution soit différente (Pillarisetty et al., 2004).

De façon générale, les DC hépatiques arborent un phénotype immature, avec une faible expression du CMH de classe II et de molécules de co-stimulation (CD40/CD80-86) (Inaba et al., 1994; Jomantaite et al., 2004; Khanna et al., 2000; Pillarisetty et al., 2004). Des études fonctionnelles comparatives démontrent également que les DC hépatiques sont inefficaces pour stimuler l'activation de lymphocytes T par rapport aux DC spléniques *in vitro* (Lu et al., 2001a; Pillarisetty et al., 2004). Dans ce sens, quelques études montrent que les DC hépatiques sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Khanna et al., 2000; Lu et al., 2001b), leur conférant un potentiel immuno-régulateur fort, se traduisant par l'induction de lymphocytes T régulateurs (Lu et al., 2001a; 2001b). Ce phénotype immature/toléro-gène des DC hépatiques leur est conféré par le microenvironnement hépatique, notamment par la présence abondante de cytokines anti-inflammatoires (principalement IL-10 et TGF- β) produites par la plupart des cellules hépatiques (cellules de Kupffer, LSEC, hépatocytes, cellules de Ito, lipocytes...) (Khanna et al., 2000; Lau and Thomson, 2003). La production de ces facteurs est elle-même conditionnée par la stimulation chronique de ces différents types cellulaires par des composés microbiens d'origine intestinale (le rôle du LPS ayant été plus particulièrement étudié) (Böttcher et al., 2011; Knolle et al., 1999; 1995).

Par ailleurs, il a été montré chez le rat que les DC hépatiques peuvent rejoindre les canaux lymphatiques via l'espace de Disse après avoir phagocyté des antigènes, et ainsi migrer jusqu'aux ganglions drainants, où elles perdent leur phénotype immature et deviennent capables d'activer la réponse T (Crispe, 2003; Kudo et al., 1997; Matsuno et al., 1996; 1995).

- *les cellules de Kupffer :*

Les cellules de Kupffer représentent la plus importante population de macrophages résidante d'un tissu, et sont majoritairement dérivés de précurseurs monocytaires circulants (ces cellules sont très peu prolifératives une fois différenciées) (Gale et al., 1978; Gordon and Taylor, 2005; Racanelli and Rehmann, 2006). Dans le foie, les cellules de Kupffer se localisent préférentiellement dans les sinusoides hépatiques et dans les zones péri-portales, leur permettant de prendre en charge efficacement les endotoxines présentes dans le sang portal, phagocyter les débris et différents micro-organismes (Filice, 1988; Wardle, 1987). Ces cellules ont également la particularité de

pouvoir phagocyter des cellules apoptotiques, propriété qui n'est retrouvée chez aucune autre population de macrophages (Racanelli and Rehermann, 2006; Shi et al., 1996). Les cellules de Kupffer expriment le CMH de classe II ainsi que des molécules de co-stimulation classiques (CD80-86), cependant leur fonction de cellule présentatrice d'antigènes a été très peu étudiée. Les quelques travaux ayant investigué ce point proposent que les cellules de Kupffer sont principalement immunosuppressives, via l'expression de PD-L1 (induisant l'anergie des lymphocytes T) et leur production de différents facteurs moléculaires comme l'oxyde nitrique et l'IL-10 (Crispe, 2009), dont la production est notamment induite via la stimulation du TLR4 par le LPS (Knolle et al., 1995). La fréquence des cellules de Kupffer ainsi que leurs propriétés immuno-régulatrices en font des acteurs majeurs dans le maintien de la tolérance à l'état d'homéostasie. Dans le cas de diverses atteintes hépatiques, les cellules de Kupffer vont perdre ce phénotype et participer de façon critique au processus d'inflammation locale (cf paragraphe 3.1.3.).

- *les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC) :*

Les LSEC ont un phénotype unique comparativement aux autres cellules endothéliales et ont la particularité d'exprimer à leur surface un ensemble de molécules leur permettant de i) capturer l'antigène efficacement (TLRs, « *scavenger receptors* »), ii) le présenter à leur surface (CMH de types I et II) et iii) d'interagir efficacement avec les lymphocytes présents dans la circulation sanguine grâce à l'expression de sélectines et adhésines (Knolle and Limmer, 2003). De plus, le fort ralentissement du flux sanguin dans les sinusoides hépatiques favorise les interactions entre les LSEC et ces leucocytes. Ces différentes propriétés font des LSEC des cellules présentatrices d'antigènes à part entière dans le foie. Les LSEC sont d'ailleurs la seule population de cellules présentatrices d'antigène non-myéloïde à avoir la capacité d'effectuer la présentation croisée (activation des LT CD8 par le CMH I) (Limmer et al., 2000). Il a été démontré que l'engagement du TLR4 des LSEC par le LPS entraîne la production d'IL-10 et diminue l'expression de molécules de co-stimulation (Knolle et al., 1999; 1998). Ainsi, les LSEC constituent vraisemblablement des acteurs essentiels pour la tolérance de la réponse T, via l'induction de lymphocytes T régulateurs et d'anergie des lymphocytes T cytotoxiques (Knolle et al., 1999; Limmer et al., 2000; 2005).

- *les cellules de Ito :*

Les cellules de Ito sont elles aussi en contact avec les antigènes présents dans la circulation, grâce à la fenestration des LSEC. Elles expriment le TLR4 (ce qui leur permet d'être répondeuses au LPS - (Paik et al., 2003)), les CMH de types I et II, ainsi qu'une forte densité de CD1d. Il a été démontré *ex vivo* que les cellules de Ito ont la capacité d'activer les réponses T et NKT (Winau et al., 2007), mais leur co-expression de molécules à caractère inhibiteur (PD-L1) indique qu'elles ont plutôt un rôle suppresseur de la réponse T (Yu et al., 2004), favorisant la tolérance.

3.2.3. Les mécanismes de domiciliation des leucocytes hépatiques

Les interactions moléculaires responsables de la rétention des leucocytes dans le foie sont mal connus, et se sont concentrés majoritairement sur le recrutement des lymphocytes T. Dans les zones de contact privilégiées que sont les sinusoides hépatiques, il apparaît que l'accumulation des lymphocytes T soit la conséquence de l'expression par les LSEC de diverses molécules d'adhésions classiques (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) ainsi qu'une molécule plus spécifique, VAP-1 (*Vascular Adhesion Protein-1*), dont l'expression semble restreinte à l'endothélium hépatique en condition normale (Bonder et al., 2005; Lalor et al., 2002; Shetty et al., 2011) (**Figure 25**). Les ICAMs vont interagir avec LFA1 exprimé à la surface des lymphocytes activés, et VAP1 interagit avec un ligand spécifiquement exprimé par les lymphocytes T CD8 mais non encore identifié (Crispe, 2003). Aujourd'hui, les facteurs induisant l'expression constitutive de ces molécules par les LSEC sont inconnues, mais il a été montré que la stimulation du TLR4 par le LPS participe à la modulation de cette expression (John and Crispe, 2005).

Une étude portant sur les lymphocytes B montre que les mêmes molécules seraient également impliquées dans leur rétention (Shetty et al., 2012). Néanmoins, la plupart de ces études ont été réalisées *in vitro*, et n'ont pas encore été confirmées clairement *in vivo*.

Par ailleurs, les NKT hépatiques expriment de façon spécifique le CXCR6, dont le ligand CXCL16 est également présent à la surface des LSEC (Geissmann et al., 2005), permettant non seulement leur recrutement, mais également la mise en place de leur fonctions d'immuno-surveillance (Geissmann et al., 2005; Jiang et al., 2005). Le CCR5 a également été montré comme indispensable au recrutement des NK dans le foie en cas d'infection par *T. gondii*, parasite responsable de la toxoplasmose (Khan et al., 2006). Les mécanismes gouvernant la domiciliation hépatique des autres types de cellules immunitaires dans le foie ne sont aujourd'hui pas connus.

De façon intéressante, entre 5 et 10% patients atteints de maladies inflammatoires chroniques (MICI) de l'intestin développent une hépatite auto-immune, voire une cholangite sclérosante primitive (PSC) (Adams and Eksteen, 2006). Les travaux du groupe de David Adams ont permis de mettre en évidence un mécanisme de domiciliation aberrant menant au recrutement de lymphocytes T pro-inflammatoires dans le foie des malades, lié à une expression anormale de molécules de domiciliation sur l'endothélium hépatique. L'hépatite auto-immune et la PSC sont caractérisées par l'expression de l'adressine MadCAM-1 sur les LSEC (Grant et al., 2001), dont l'expression est normalement restreinte à la muqueuse intestinale, et responsable de l'interaction avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée par les lymphocytes T effecteurs activés dans le GALT des patients atteints de MICI. Couplée à l'augmentation de l'expression de VAP-1 et à l'apparition de CCL25 (ligand de CCR9 présent sur les lymphocytes muqueux) (Eksteen et al., 2004) en conditions

inflammatoires dans les sinusoides hépatiques, ces lymphocytes T aux propriétés pro-inflammatoires peuvent constituer jusqu'à 20% de l'infiltrat immunitaire hépatique chez ces patients, et participent activement à l'inflammation du foie (Adams et al., 2008; Adams and Eksteen, 2006) (**Figure 25**). Dans le sens inverse, les patients atteints de PSC développent dans 75% des cas une MICI (Broomé et al., 1996), via l'activation dans le foie de lymphocytes T pro-inflammatoires aux propriétés de domiciliation muqueuse (Adams and Eksteen, 2006).

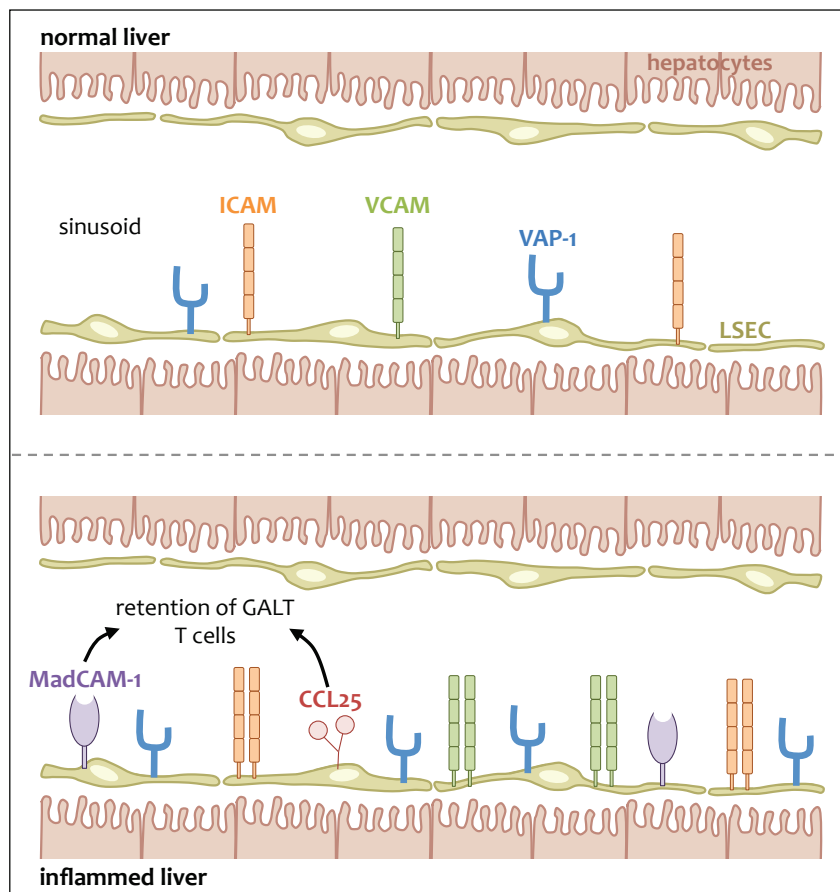


Figure 25. Les molécules d'adhésion responsables de la domiciliation des LT dans le foie normal et inflammatoire.

En condition normale, les LSEC expriment faiblement les molécules classiques d'adhésion ICAM et VCAM, ainsi que VAP-1, spécifiquement exprimée dans le foie.

En condition inflammatoire, les LSEC présentent un niveau d'expression augmenté de ces mêmes molécules, et expriment MadCAM-1 et CCL25, responsables de la rétention des LT activés dans le GALT (expression de $\alpha 4\beta 7$ et CCR9). Chez les patients atteints de MICI, les LT pro-inflammatoires ainsi retenus participent activement au développement de la pathologie inflammatoire hépatique.

3.3. FOIE ET TOLÉRANCE IMMUNITAIRE

Comme décrit dans les paragraphes précédents, le foie abrite diverses populations de cellules présentatrices d'antigènes, d'origine hématopoïétique ou mésenchymateuse, et dont la principale caractéristique est de présenter des capacités tolérogènes en conditions homéostatiques. Ainsi, l'arrivée d'un antigène dans le foie a pour conséquence d'induire une tolérance immunitaire locale et systémique. Cependant, en condition pathologique, et particulièrement dans le cas d'infections virales, le foie peut constituer un site d'initiation efficace de la réponse immunitaire.

3.3.1. Transplantation et tolérance hépatique

Il y a bientôt cinquante ans, plusieurs équipes de recherche démontrent chez le chien et le porc qu'une allogreffe orthotopique de foie peut être tolérée sans traitement immunosuppresseur, et qu'une greffe simultanée d'un autre organe est également tolérée, alors qu'elle serait normalement rejetée rapidement (Barker and Corriere, 1967; Calne et al., 1969a; 1969b). Ces observations ont été ensuite confirmées chez le rat (Kamada et al., 1981a; 1981b). Les auteurs décrivent une réaction de rejet modérée et transitoire, mais dont l'évolution est souvent positive. Ainsi, le foie et les organes greffés simultanément récupèrent de cet épisode et sont acceptés indéfiniment. Par ailleurs, d'autres études ont montré chez le rat que la seule injection d'antigènes du donneur (le plus souvent des cellules de la moelle ou de la rate) directement dans la veine porte du receveur, avant la transplantation, permet d'induire un état de tolérance, tandis qu'une même injection dans les voies systémique n'a aucun effet (Gorczynski et al., 1994; Rao et al., 1988; Yu et al., 1994).

Plusieurs études cliniques réalisées sur des cohortes de patients greffés du foie ont révélé qu'un nombre important d'individus développe un état de tolérance envers le greffon. Chez certains de ces patients, les traitements immunosuppresseurs ont pu être interrompus totalement sans déclencher de rejet (la Garza et al., 2013; Mazariegos et al., 1997; Takatsuki et al., 2001).

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer cette résistance au rejet, et il apparaît que l'induction de l'apoptose intra-hépatique des lymphocytes T CD8 alloréactifs constitue un élément clé dans la tolérance immunitaire liée au foie. Lors d'une greffe, si le système immunitaire du patient n'est pas contrôlé par un traitement immunosuppresseur, le rejet aigu consiste majoritairement en une activation massive des lymphocytes T CD8 du receveur suite à la reconnaissance d'antigènes du non-soi présentés par le CMH de classe I exprimé sur les cellules du greffon. S'en suivent une prolifération et une différenciation massive en lymphocytes T cytotoxiques envers les cellules du greffon, conduisant au rejet. Dans le contexte de transplantation hépatique, il a été montré, grâce à un modèle murin dans lequel les hépatocytes expriment une molécule de classe I allogénique, que les lymphocytes T CD8 s'activent et s'accumulent de façon rapide dans le foie, puis entrent en apoptose (Bertolino et al., 1995; 1998).

Les mécanismes responsables de l'élimination des lymphocytes T CD8 activés ont été partiellement décryptés à l'heure actuelle (**Figure 26**). Plusieurs études ont tout de même pointé du doigt le rôle de récepteurs induisant la mort cellulaire tels que Fas. En effet, la voie Fas-FasL joue un rôle clé dans la délétion des lymphocytes T dans les organes périphériques (Green et al., 2003; Krueger et al., 2003), et des études ont rapporté l'expression de Fas par les hépatocytes (Ogasawara et al., 1993; Schlosser et al., 2000). Cependant, ces études *in vitro* restent sommaires et nécessitent des

compléments d'études, de ce fait, le rôle potentiel de la voie Fas/FasL dans la délétion des lymphocytes T CD8 *in vivo* reste à éclaircir (Liu et al., 2001; Mehal and Crispe, 1998). D'autres études montrent que la délétion des lymphocytes T CD8 dans le foie résulte de l'induction d'apoptose par des acteurs solubles comme le TNF- α (Huang et al., 1994; Murray and Crispe, 2004; Qian et al., 1997). La voie PD-1/PD-L1 a également été mise en question dans le processus de tolérisation des lymphocytes T dans le foie. En effet, PD-L1 est exprimé par la plupart des cellules parenchymateuses hépatiques et par les cellules de Kupffer (Iwai et al., 2003), et il a été démontré que les souris déficientes pour cette molécule présentent une accumulation de T CD8 dans le foie et développent une hépatite auto-immune (Dong et al., 2004).

Plus récemment, l'équipe de Patrick Bertolino a décrit un mécanisme original qui pourrait être à l'origine de la délétion des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène : l'empéripolèse suicidaire (**Figure 26**). Ce mécanisme est caractérisé par la capture des lymphocytes T CD8 spécifiques par les hépatocytes, suivie de leur endocytose et leur destruction par le lysosome (Benseler et al., 2011). L'empéripolèse suicidaire est dépendante de la reconnaissance du complexe CMH-I/peptide (hépatocyte) par le TCR du T CD8, indépendante des voies de l'apoptose, et ne nécessite pas la présence de phagocytes comme les cellules de Kupffer.

Par ailleurs, le transfert à une souris naïve de lymphocytes hépatiques provenant d'une souris tolérisée par l'injection d'un antigène allogénique dans la veine porte permet d'induire un état de tolérance chez la souris receveuse. Ceci indique que l'induction de l'apoptose et l'empéripolèse suicidaire subies par les lymphocytes T CD8 activés ne sont pas les seuls mécanismes permettant d'induire la tolérance au niveau hépatique, et pointent du doigt une potentielle action des lymphocytes T régulateurs. Il apparaît que la présentation antigénique par les LSEC, couplée à leur production de cytokines anti-inflammatoire liée à la stimulation par le LPS, permet de potentialiser la différenciation de lymphocytes T naïfs en T régulateurs (Knolle et al., 1999). Si le rôle des lymphocytes T régulateurs dans le maintien de la tolérance n'est que partiellement établi, il apparaît que ces cellules participent activement au contrôle de l'activation de lymphocytes T CD4 naïfs, une activité qui est finement régulée par différentes cellules présentatrices d'antigène du foie, notamment les cellules de Kupffer, les LSEC ou encore les hépatocytes (Wiegard et al., 2005). Une étude menée chez le rat montre que lors d'une allogreffe de foie, le greffon est infiltré d'une population de lymphocytes T CD4 aux capacités régulatrices jouant un rôle majeur dans la tolérance à la greffe (Otto et al., 2002), étant donné leur capacité à conférer la tolérance à un receveur naïf après leur transfert adoptif (Asakura et al., 2004).

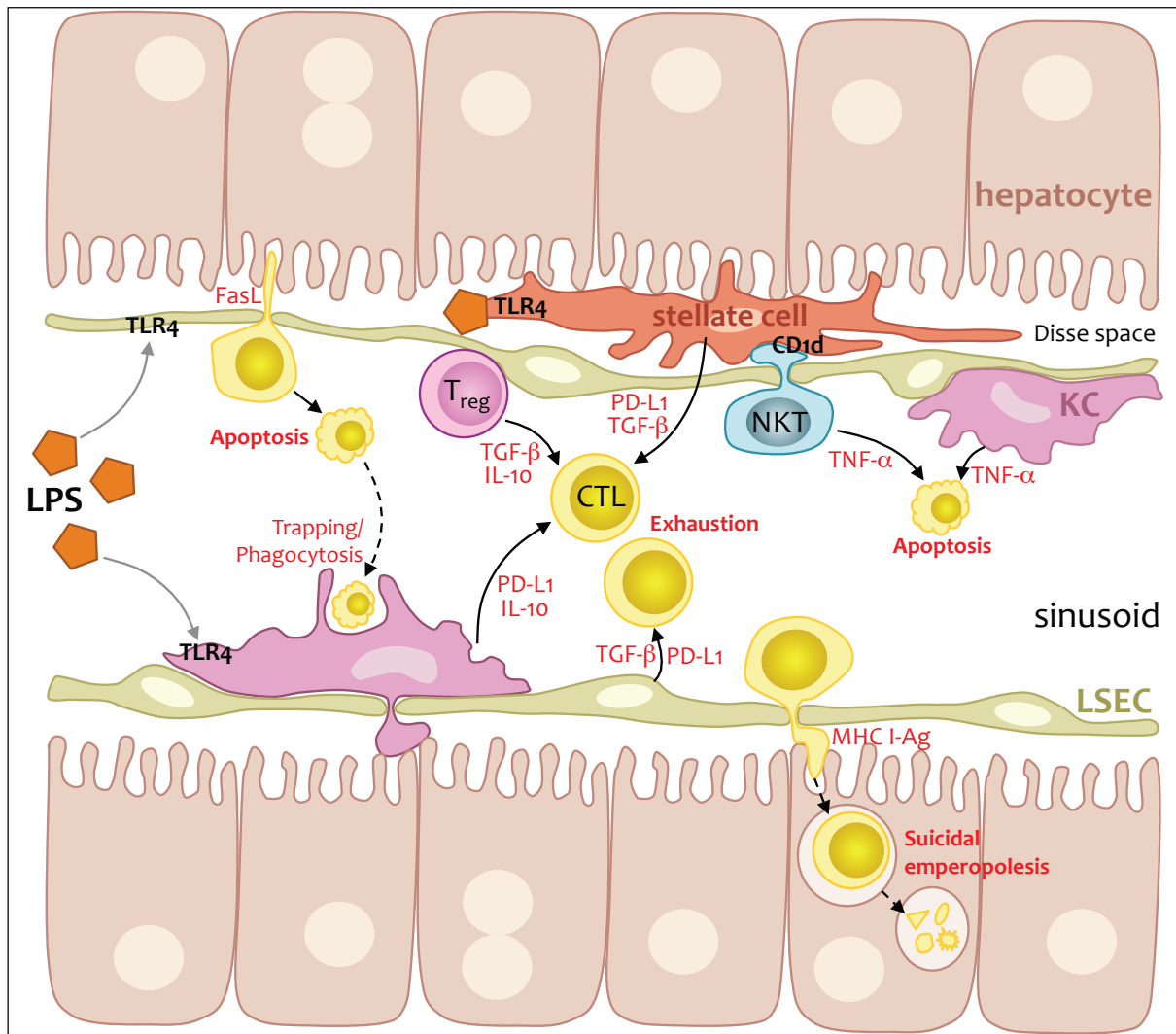


Figure 26. Mécanismes de la tolérance hépatique.

La stimulation chronique des cellules parenchymateuses hépatiques et des cellules de Kupffer par le LPS d'origine intestinale induit l'expression et la production de nombreux facteurs immunosuppresseurs menant à la suppression des lymphocytes T CD8 (CTL) par apoptose, anergie ou empériopèse suicidaire. Par ailleurs, les propriétés tolérogènes des CPA hépatiques permettent la différenciation de lymphocytes T régulateurs, sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires et contrôlant le développement de réponses T CD4 effectrices.

3.3.2. Rôle du foie dans la tolérance orale

Il a été estimé qu'environ 2 à 5% des protéines alimentaires sont retrouvées sous forme native ou partiellement dégradée dans la circulation sanguine périphérique (Husby et al., 1986). On peut donc raisonnablement penser que le sang entrant dans le foie par la veine porte contient une quantité significative de composés issus de l'alimentation. Dans ce sens, un haptène modèle administré par voie orale chez la souris est détectable dans le foie dans les heures suivant le gavage (Ju and Pohl, 2001). Le drainage veineux du tube digestif étant assuré principalement par la veine porte, la capture et l'apprêtement des antigènes alimentaires dans le foie constitue un élément indispensable de l'axe entéro-hépatique permettant le maintien de la tolérance orale aux

antigènes alimentaires. Cette hypothèse a été validée expérimentalement à plusieurs reprises, en montrant que l'injection d'antigènes allogéniques ou de protéines solubles directement dans la veine porte conduit à l'induction de la tolérance T de façon aussi efficace que lorsque l'antigène est apporté par voie orale, tandis que l'injection dans la circulation périphérique n'a aucun effet (Chen et al., 2001; Morita et al., 1998; Nagano et al., 1992; Qian et al., 1985; Yu et al., 1994). La réalisation d'un shunt porto-cave ou porto-systémique (acte chirurgical visant à relier la veine porte directement à la veine cave inférieure ou à une autre veine de la circulation périphérique permettant au flux sanguin porte de ne pas passer dans le foie) conduit par ailleurs systématiquement à la rupture de la tolérance T vis à vis d'antigènes de type alimentaire (haptènes, protéines) (Cantor and Dumont, 1967; Yang et al., 1994).

Là encore, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent au foie d'induire cette tolérance ne sont que partiellement décrits. Plusieurs études ont néanmoins proposé une participation de différentes populations cellulaires du foie comme les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques ou encore les LSEC (Breous et al., 2009). Comme évoqué précédemment, la stimulation du TLR4 exprimé par les cellules de Kupffer et les LSEC par du LPS mène à la production de facteurs immuno-régulateurs comme l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β , et il a été montré que ces cellules favorisent la différenciation de lymphocytes T régulateurs, eux mêmes capables de produire ces mêmes cytokines (Breous et al., 2009; Knolle et al., 1999; 1995). L'environnement cytokinique des sinusoides hépatiques va donc contribuer fortement à la suppression des réponses T pro-inflammatoires (**Figure 26**). Très peu d'études se sont intéressées au compartiment des lymphocytes T régulateurs infiltrant le foie, ce malgré les récentes études appuyant leur rôle direct dans les mécanismes locaux de tolérance (Breous et al., 2009). De plus, l'administration orale d'un antigène a pour conséquence l'apoptose massive de lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène couplée à une apparition significative de lymphocytes T régulateurs (Watanabe et al., 2002). Par ailleurs, une étude a montré que l'administration orale d'un antigène conduit à sa présentation par les cellules phagocytaires CD11c⁺ hépatiques, responsable à la fois de la délétion des lymphocytes T CD4 effecteurs spécifiques de l'antigène et une différenciation en T régulateurs (Watanabe et al., 2003), démontrant ainsi un rôle important des DC conventionnelles hépatiques dans l'induction de la tolérance orale. En parallèle, notre équipe a montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui sont fortement enrichies dans le foie par rapport aux organes lymphoïdes périphériques, sont capables de capter et de présenter un antigène délivré par voie orale dans le foie, menant à la suppression des réponses T CD8 pro-inflammatoires (Goubier et al., 2008). Ce mécanisme de délétion des T CD8 dans le foie, couplé à la génération de lymphocytes T régulateurs dans les ganglions mésentériques suite à la présentation de l'antigène oral par les DC intestinales, et responsable de la délétion systémique de LT effecteurs spécifiques, ont été montré comme étant

deux mécanismes nécessaires et complémentaires dans le maintien de la tolérance orale à un Ag modèle (Dubois et al., 2009).

3.3.3. Rupture de tolérance et mise en place de réponses immunitaires efficaces en contexte infectieux

Les propriétés tolérogènes du foie, notamment liées aux propriétés des cellules présentatrices d'antigène hépatiques et la présence de lymphocytes T régulateurs, constituent une barrière évidente à la mise en place de réponses immunitaires cytotoxiques efficaces face aux infections virales (Boettler et al., 2005; Gerlach et al., 1999; Wedemeyer et al., 2002). En effet, l'installation d'une infection chronique chez les patients atteints par le virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C est permise par l'échappement immunitaire du virus dans l'environnement hépatique. La génération de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques dans le foie ou dans les organes lymphoïdes périphérique est suivie de leur accumulation dans le parenchyme hépatique, suivie de leur suppression, comme décrit dans les paragraphes ci-dessus. Néanmoins, plusieurs observations effectuées chez le patient ainsi que des études expérimentales chez la souris démontrent qu'une réponse immunitaire efficace peut se développer dans le foie (Lechner et al., 2000).

La formation de structures lymphoïdes tertiaires (cf paragraphe 3.2.1) est un événement retrouvé chez 50% des patients atteints d'infection chronique par l'hépatite C. Ces structures sont également présentes dans beaucoup d'autres pathologies hépatiques comme la cirrhose biliaire primitive, l'hépatite auto-immune ou encore l'infection chronique par l'hépatite B, mais sont beaucoup moins fréquentes (Bach et al., 1992). De façon intéressante, il a été montré dans le contexte de l'infection chronique par HCV que ces structures peuvent prendre la forme de follicules organisés et mener à la génération d'une réponse humorale fonctionnelle, notamment permise par la présence de cellules dendritiques matures, de lymphocytes T_{FH} et de cellules dendritiques folliculaires, et principalement caractérisée par la production d'IgG spécifiques (Murakami et al., 1999). D'autre part, le groupe de Percy Knolle a récemment mis en évidence un autre type de structure caractérisée par un agrégat de cellules myéloïdes contenant en son centre des lymphocytes T cytotoxiques en expansion (iMATEs : « *intrahepatic Myeloid-cell Aggregates for T cell population Expansion* »). Les auteurs montrent ainsi dans un contexte d'infection virale chronique, mimée par l'apport de ligands de TLR9 ou par l'infection avec un adénovirus recombinant, la formation d'iMATEs par des cellules dendritiques inflammatoires dérivées de monocytes permet l'expansion efficace de lymphocytes T cytotoxiques activés dans les organes lymphoïdes secondaires, et contribuent ainsi de façon critique à l'immunité antivirale locale (Huang et al., 2013).

3.4. ROLE DU FOIE DANS LA REPOSE HUMORALE A IgA : ETAT DES LIEUX

Une potentielle relation entre le foie et les IgA a été démontrée il y a très longtemps, bien avant toute description du compartiment leucocytaire hépatique et les premiers travaux proposant un rôle important du foie dans l'immunité. Plusieurs équipes de recherches spécialisées en biochimie observaient alors qu'il existe un mécanisme dynamique permettant de transporter les IgA sériques jusqu'à la bile. Néanmoins, la forte concentration ainsi que la nature des IgA présentes dans la bile avait déjà attiré l'attention des auteurs sur le fait qu'une source locale d'IgA était à envisager. Par ailleurs, des études menées chez des patients souffrant d'atteintes hépatiques alcooliques montrant que cette pathologie est associée à des désordres dans la réponse IgA pointent du doigt le rôle du foie dans la biologie de la réponse IgA.

3.4.1. Le transport hépatobiliaire des IgA

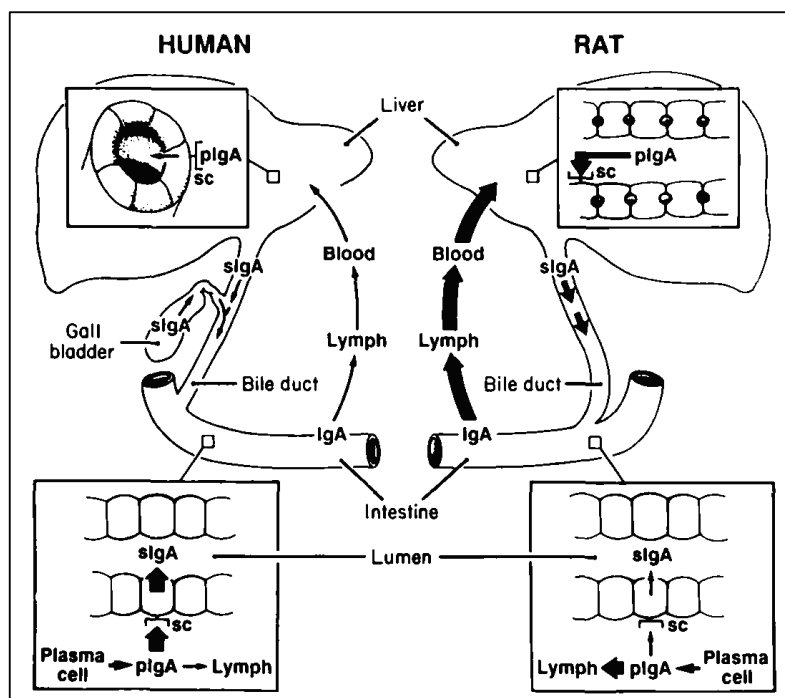
Entre la fin des années '70 et le début des années '80, plusieurs groupes se sont intéressés au devenir des IgA au sein d'un individu. Ils remarquent alors que, chez le rat, la grande quantité et la nature des IgA produites par les plasmocytes de la muqueuse intestinale ne se reflète pas au niveau sanguin, où leur concentration est relativement faible, et qu'il doit donc exister un mécanisme de clairance efficace des IgA sériques (Hall et al., 1979; Orlans et al., 1983; 1978). Les auteurs, grâce à des procédures d'injection d'IgA monomériques ou polymériques, d'IgM ou d'IgG marquées par des radio-isotopes, montrent que les plgA sont très rapidement et sélectivement éliminées du sang et sont retrouvées sous une forme sécrétoire dans la bile (Jackson et al., 1978). Ils montrent par ailleurs que des plgA marquées sont retrouvées dans les fèces, sous une forme non dégradée (Orlans et al., 1978), et constituent également la majorité des SIgA présentes dans le jéjunum (Lemaître-Coelho et al., 1978). La preuve de l'existence d'un transport hépatobiliaire des IgA est apportée par la mise en évidence de l'expression du plgR par les hépatocytes chez le rat, responsable de la capture des plgA et de leur transport vésiculaire jusqu'aux canalicules biliaires (Socken et al., 1979). Ce mécanisme a également été impliqué dans le transport de complexes immuns IgA-antigène du sang vers la bile (Brown et al., 1982; Harmatz et al., 1982; Socken et al., 1981). L'ensemble de ces travaux démontrent que le transport hépatobiliaire des plgA participe de façon critique à i) la clairance sanguine d'anticorps non-relevants dans la protection systémique, ii) l'apport de plgA dans la partie haute du tube digestif où la production locale est réduite et iii) l'élimination de complexes immuns IgA-antigènes de la circulation sanguine.

Des études menées chez l'Homme et d'autres mammifères (primates, chiens, cochons d'inde) ne confirment qu'en partie les résultats obtenus chez le rat. La bile humaine est sélectivement enrichie en plgA, dont 70 à 95% sont sous forme sécrétoire, tandis que seulement 13% des IgA sont polymériques dans le sang (Delacroix et al., 1982b). Néanmoins, il apparaît que le système de transport hépatobiliaire n'est pas aussi efficace que chez le rat (**Figure 27**). L'injection d'immunoglobulines marquées par voie intraveineuse permet d'observer que seuls 50% des plgA retrouvées dans la bile proviennent du sang (Delacroix et al., 1982b). A la différence du rat, l'expression du plgR dans le foie est restreinte aux cellules épithéliales biliaires, et inexistante à la surface des hépatocytes (Nagura et al., 1981). Enfin, chez la souris, malgré une expression du plgR par les hépatocytes, ce mécanisme est beaucoup moins efficace que chez le rat, et les auteurs montrent que les IgA transportées sont en partie catabolisées, le reste étant déversé dans la bile (Delacroix et al., 1985). Ainsi, il apparaît que le transport hépatobiliaire de la souris soit un compromis entre les mécanismes décrits chez le rat et chez l'Homme, et constitue ainsi un modèle d'étude plus pertinent vis à vis de la contrepartie humaine.

Figure 27.
Le transport hépatobiliaire chez l'Homme et le rat.

Chez le rat, environ 90% des IgA retrouvées dans l'intestin sont issues de la clairance des plgA sériques par le transport hépatobiliaire. Chez l'Homme, la majeure partie des plgA sécrétées dans la muqueuse sont transportées par l'épithélium jusqu'à la lumière intestinale. Néanmoins il existe une fraction significative d'IgA dans le sérum qui peut être transloquée dans la bile via l'épithélium des canaux biliaires hépatiques. Enfin, une production locale, notamment décrite au niveau de la muqueuse de la vésicule biliaire, peut contribuer au taux d'IgA sécrétoires biliaires.

(tiré de Brown et al, 1989)



Diverses études montrent qu'il peut exister un transport des IgA dans les hépatocytes dépendant d'un autre récepteur, dont le principal candidat est le récepteur à l'asialoglycoprotéine (Brown and Kloppel, 1989a; Tomana et al., 1988). Mais les études adressant directement la question du rôle de ce récepteur vis à vis du transport des IgA montrent que seule une faible proportion des IgA transportées par ce biais sont retrouvées dans la bile, tandis que la majeure partie des IgA est en

fait catabolisée dans l'hépatocyte, et est de nature monomérique (Mestecky et al., 1989; Schiff and Underdown, 1985). A partir de ces observations, quelques auteurs ont proposé que, chez l'Homme et les autres espèces chez qui le transport hépatobiliaire est moins efficace, il existe une production locale d'IgA dans le foie ou les tissus biliaires extra-hépatiques (Brown and Kloppel, 1989b; 1989a). Si la source exacte de ces plgA n'a pas encore été définitivement établie, il a tout de même été démontré chez l'Homme et le rat qu'il existe un contingent de plasmocytes à IgA dans le tissu conjonctif associés aux principaux canaux biliaires du foie (Nagura et al., 1983), dans la paroi de la vésicule biliaire (Vuitton et al., 1985), et également dans le parenchyme hépatique à proximité des canaux biliaires (Manning et al., 1984; Nagura et al., 1981). Ces différents sites pourraient alors constituer la principale source des SIgA biliaires non dérivées du sérum.

Malgré ces découvertes originales et prometteuses, il est très difficile de trouver dans la littérature plus récente des études validant ces observations. Ainsi, le rôle proposé du foie dans la clairance d'antigènes présents dans le sang et l'apport important de SIgA dans la partie supérieure de l'intestin grêle n'ont jamais été clairement confirmés. L'origine exacte des plasmocytes à IgA présents dans le foie et les tissus biliaires n'est pas connue.

3.4.2. Réponse IgA intra-hépatique

Outre les quelques études rapportant que la muqueuse biliaire constitue un site de production de plgA, très peu d'observations ont pu être menées sur le foie humain, et seules des études sporadiques menées chez l'animal, datant de la même période (1980-1990), ont adressé la question de l'existence d'une production d'immunoglobulines au sein du foie.

Une des premières études a observé chez le rat que le foie contient 20 à 30 fois plus de cellules sécrétrices d'anticorps (*Antibody-Forming Cells*) que la rate ou le sang, à l'homéostasie (Manning et al., 1984).

Une seconde étude toujours chez le rat montre que l'administration intra-duodénale de toxine cholérique entraîne une apparition précoce dans le foie de cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de la toxine, précèdent l'apparition de ces anticorps dans la bile. Ils observent également qu'une seconde immunisation est nécessaire pour engendrer l'apparition significative de plasmocytes spécifiques de l'antigène dans la muqueuse intestinale, tandis que d'autres plasmocytes sont à nouveau générés dans le foie (**Figure 28**).

Aussi bien après la première que la seconde immunisation, ils estiment qu'environ 80% des plasmocytes hépatiques générés sécrètent des IgA spécifiques de la toxine cholérique. Grâce à des expériences de canulation de la bile couplée à la perfusion d'IgA marquées d'un isotope radioactif dans la veine porte, les auteurs démontrent que suite à la première immunisation, 70% des IgA

spécifiques dans la bile sont issues de la production locale par les plasmocytes hépatiques, tandis qu'elles ne représentent que 30% suite à la seconde immunisation (Altorfer et al., 1987). Ainsi, cette étude prouve pour la première fois qu'il existe une réponse IgA intra-hépatique rapide et transitoire dirigée contre des antigènes intestinaux, contribuant de façon significative à l'apport d'IgA spécifiques dans la bile, notamment suite à la première rencontre avec l'antigène.

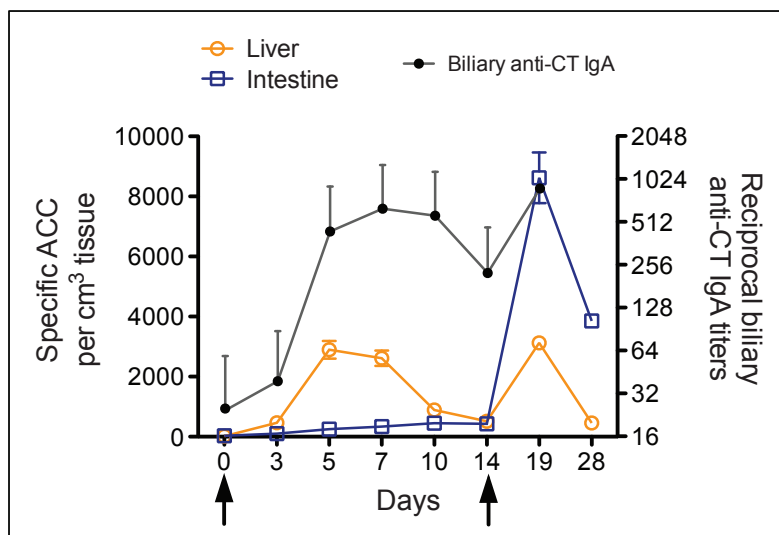


Figure 28.

Réponse IgA hépatique chez le rat après immunisation intra-gastrique.

Suite à l'injection de toxine cholérique (CT) dans le duodénum, les auteurs observent une apparition de plasmocytes spécifiques de l'antigène dans le foie, corrélée à l'apparition d'IgA anti-CT dans la bile. Une deuxième immunisation est nécessaire pour générer un contingent intestinal significatif de plasmocytes spécifiques.

ACC : Antibody-Containing Cells

(adapté de Altorfer et al, 1989)

Deux autres études, menées respectivement chez le rat et la souris, démontrent que l'immunisation orale ou systémique avec un antigène entraîne une apparition précoce de plasmocytes hépatiques spécifiques de l'antigène, confirmant ainsi que le foie doit être considéré comme un organe effecteur à part entière de la réponse humorale, rôle jusqu'à lors réservé à la muqueuse intestinale vis à vis d'antigènes oraux, ou à la rate pour les antigènes systémiques (Carter et al., 1989; Wu, 1992).

Il est très étonnant de remarquer que depuis ces dernières études datant d'une vingtaine d'années, rien n'a été publié à ce sujet. L'origine de ces cellules, leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles restent totalement inexplorées, et le fait que le foie puisse constituer un site inducteur et/ou effecteur de la réponse humorale à IgA sont à investiguer.

3.4.3. IgA et maladies hépatiques alcooliques

De nombreuses études appuient le fait qu'il existe une relation entre le foie et la réponse IgA dans les maladies hépatobiliaires. Il a été reporté de longue date une augmentation des IgA sériques chez les patients atteints de maladies hépatiques d'étiologies diverses : stéatohépatite non-alcoolique, cirrhose biliaire primitive ou secondaire, hépatites chroniques actives (virales), cirrhose

alcoolique (Chandy et al., 1983; Kutteh et al., 1982b; Wilson et al., 1969)... Dans l'ensemble de ces pathologies avancées, l'altération de la fonction hépatique globale impliquant un défaut de catabolisme et l'obstruction des voies biliaires par la fibrose sont à l'origine du défaut de transport des IgA de la circulation vers la bile, expliquant le taux augmenté des IgA sériques. Cependant, les hépatopathies alcooliques (ou ALD : *Alcoholic-Liver Disease*) sont caractérisées par une augmentation significative des IgA sériques, même à des stades peu avancés d'atteintes hépatiques (fibrose et stéatose modérées) (van de Wiel et al., 1987a; 1987b; 1988), phénomène qui ne peut donc pas être relié directement à un défaut de la fonction hépatique. A ce jour, cette augmentation reste relativement incomprise. L'ALD est également caractérisée par la présence d'un dépôt continu d'IgA le long des sinusoides hépatiques. La nature des IgA constituant ce dépôt a été débattue pendant plusieurs années, mais il apparaît qu'il soit majoritairement composé d'IgA1 monomériques (Amano et al., 1988; van de Wiel et al., 1987a). Ce dépôt n'est pas simplement la conséquence de l'augmentation du taux d'IgA sériques car il est absent chez des patients atteints d'hépatopathies d'étiologies autres (non-alcooliques) ou de myélome à IgA (van de Wiel et al., 1987a). Il a d'ailleurs été proposé de rechercher ce dépôt comme outil diagnostique sur des biopsies hépatiques, afin de révéler les hépatopathies d'origine alcoolique. La nature des IgA formant ce dépôt est différente des IgA produites dans la muqueuse intestinale (IgA1 et 2 polymériques principalement) et propose donc qu'il puisse exister un site alternatif de production de ces IgA.

L'analyse de la spécificité des IgA sériques de ces malades a pu mettre en évidence la réactivité envers des antigènes alimentaires (Russell et al., 1987; Volta et al., 1987) et bactériens (Bjorneboe et al., 1972; Nolan et al., 1986; Staun-Olsen et al., 1983), mais ce n'est que plus tard qu'il a été découvert que les patients souffrant d'ALD ont une perméabilité intestinale accrue (Cariello et al., 2010; Parlesak et al., 2000). Ainsi, ces patients présentent une concentration anormalement forte en composés bactériens dans la circulation sanguine périphérique, dont la quantité est en corrélation directe avec l'augmentation des IgA sériques spécifiques de ce type d'antigènes (Nolan et al., 1986; Staun-Olsen et al., 1983). Les observations de ce phénomène chez les patients cirrhotiques sont d'ailleurs à l'origine de la notion d'axe entéro-hépatique (Szabo, 2015; Volta et al., 1987), développé par la suite dans le contexte non-pathologique au vue de son importance fonctionnelle (cf paragraphe 3.1.3). Il a par ailleurs été démontré que les endotoxines d'origine intestinale contribuent significativement à l'inflammation hépatique, en stimulant fortement la production de cytokines pro-inflammatoires par différentes cellules résidentes du foie (cf paragraphe 3.1.3) (Balmer et al., 2014; Jirillo et al., 2002; Lin et al., 2012; Nolan, 1989; Parlesak et al., 2000).

L'ensemble de ces observations mènent donc à l'hypothèse que lors du développement de l'ALD, l'augmentation de la perméabilité intestinale (effet direct de la prise d'alcool) entraîne une

translocation accrue de composés bactériens provenant de l'intestin dans la circulation porte. Ces antigènes engendrent une réponse IgA spécifique, potentiellement d'origine non muqueuse étant donné la nature de ces IgA. Il a été également démontré que ces IgA spécifiques permettent de modérer l'inflammation via la création de complexes immuns IgA-antigène (Parlesak et al., 2002). Ces complexes immuns peuvent ainsi être éliminés par les cellules de Kupffer via le Fc α RI (van Egmond et al., 2000), et ainsi éviter le contact des antigènes avec les PRR exprimés par les cellules du parenchyme hépatique, pouvant engendrer une réponse pro-inflammatoire forte. On pourrait alors proposer que le rôle des IgA dans le foie serait de participer à la clairance des antigènes d'origine intestinale, permettant ainsi de maintenir une tolérance systémique vis-à-vis de la flore. Cependant, dans ce contexte pathologique, ce mécanisme pourrait être insuffisant face à la grande quantité de complexes immuns IgA-antigène formés. L'accumulation de ces complexes immuns au niveau des sinusoides hépatiques pourrait d'ailleurs être à l'origine des dépôts d'IgA précédemment décrits. Par ailleurs, le manque d'efficacité du foie dans l'élimination de ces complexes immuns lors de cirrhoses alcooliques avancées est fréquemment corrélé au développement de pathologies comme la néphropathie secondaire à IgA (Amore et al., 1994; Lhotta, 2002; Pouria and Barratt, 2008), consistant en un dépôt de complexes immuns IgA1-antigène au niveau du mésangium et menant à l'insuffisance rénale.

Une des questions restant en suspend est l'origine anatomique des IgA responsables des désordres observés chez les patients atteints d'ALD, voire de néphropathie, et de déterminer si la présence de ces IgA est plutôt bénéfique ou délétère dans ce contexte. Il a été néanmoins proposé que dans ces pathologies, il existe une dérégulation du mécanisme de domiciliation des plasmocytes à IgA, qui au lieu d'aller se localiser dans la muqueuse intestinale, vont rejoindre un site systémique, comme la moelle osseuse par exemple (Barratt et al., 2009; Boyd et al., 2012; Wyatt and Julian, 2013). Cette hypothèse, qui n'est appuyée par aucune preuve expérimentale à ce jour, est tout de même à mettre en regard d'une étude anatomopathologique de la fin des années '60, qui sur une cohorte de patients atteints d'hépatopathies d'étiologies diverses (cirrhose alcoolique, stéatose non-alcoolique, cholangite sclérosante primitive des voies biliaires, hépatites virales...), montre que les foies de patients atteints d'hépatopathies alcooliques présentent une augmentation significative de plasmocytes à IgA dans leur parenchyme (Hadziyannis et al., 1969). Les auteurs montrent également qu'il existe une corrélation entre la quantité de plasmocytes à IgA dans le parenchyme et le taux d'IgA sérique. Ainsi, l'hypothèse que le foie soit susceptible de constituer un site majeur pour la production des IgA retrouvées dans les ALD est à envisager (**Figure 29**).

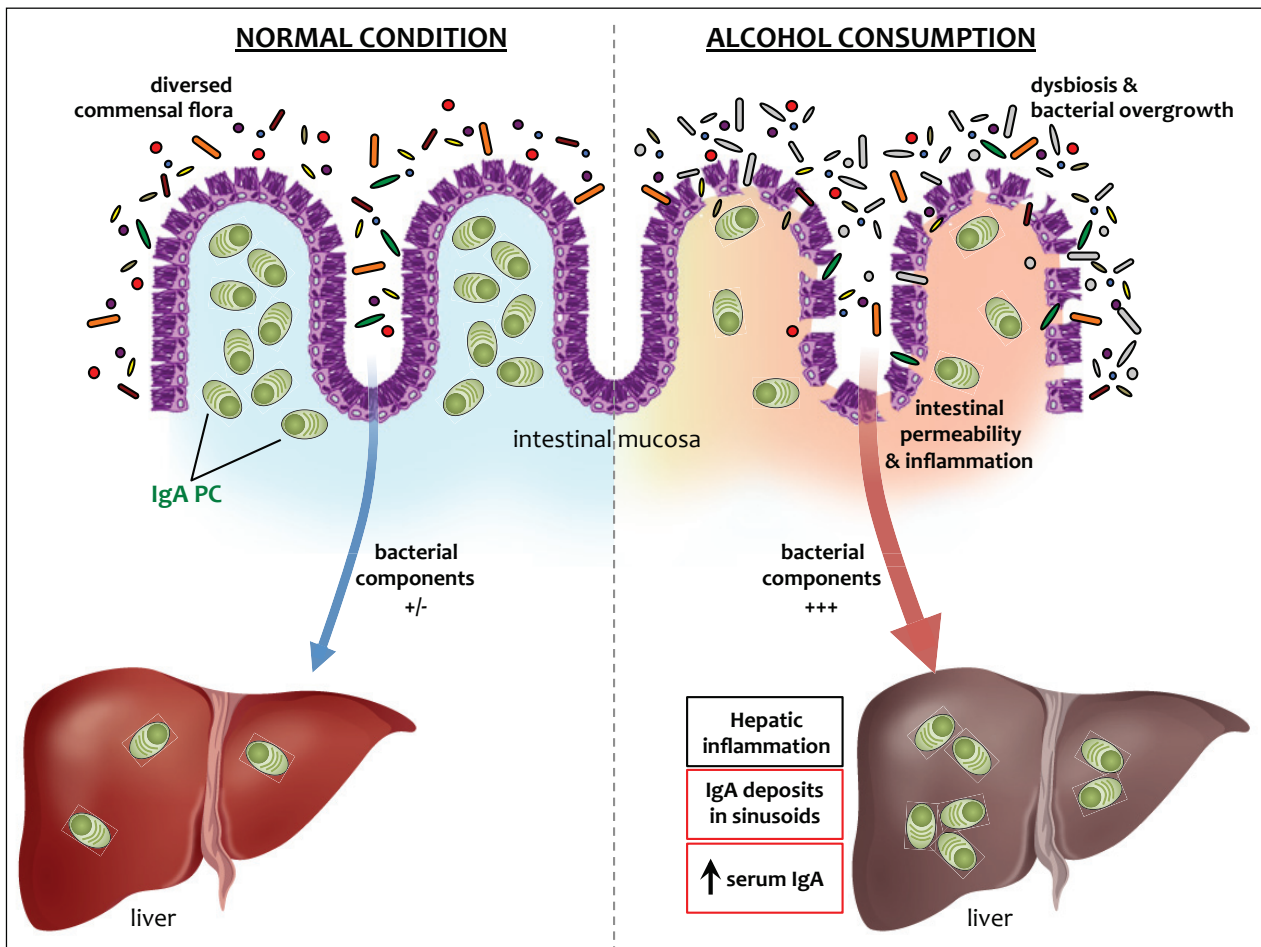


Figure 29. Dérégulation de la réponse IgA dans l'hépatopathie alcoolique - hypothèses.

En condition normale, les PC à IgA hébergés dans la muqueuse intestinale participent au maintien de la diversité de la flore commensale et limitent leur pénétration dans la muqueuse et les voies systémiques. Chez les patients atteints d'ALD, la consommation d'éthanol entraîne la formation de brèches dans la barrière épithéliale et une modification des espèces bactériennes de la flore. Ces bactéries pénètrent de façon accrue dans la muqueuse, entraînant une inflammation locale pouvant défavoriser la survie des PC à IgA de la Lamina Propria. L'alcool ainsi que l'arrivée massive de composés bactériens dans le foie par la veine porte contribuent de façon critique au développement de l'inflammation hépatique. Cette maladie est également caractérisée par une augmentation significative des IgA sériques et la présence de dépôts d'IgA dans les sinusoides hépatique. Différentes données de la littérature nous mènent à formuler l'hypothèse que dans ces conditions, une production locale d'IgA par les PC dans le foie serait responsable de ces désordres.

OBJECTIFS

Les travaux de l'équipe d'accueil ont permis de démontrer que le foie est un site privilégié de l'induction de la tolérance orale, via l'action des pDC. Ces mêmes cellules ont été également récemment impliquées dans l'induction de la réponse IgA, un mécanisme qui, en association avec la tolérance orale, permet de maintenir l'homéostasie intestinale. Les objectifs de cette thèse ont porté sur l'étude de l'implication du foie et des pDC dans la réponse IgA.

Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse IgA intestinale non-infectieuse

Les travaux de l'équipe montrant que les pDC sont fortement enrichies dans le foie et jouent un rôle majeur dans le processus de tolérance orale (Goubier et al., 2008) ainsi qu'une étude récente montrant que ces mêmes cellules ont une forte capacité à induire la commutation isotypique vers IgA *in vitro* (Tezuka et al., 2011b) nous ont amené à nous poser la question du rôle de ces cellules dans la réponse IgA hépatique. Or, des tests préliminaires de co-culture *in vitro* de lymphocytes B naïfs et de pDC provenant de mLN ou de foie ne nous ont pas permis de détecter un effet majeur de ces cellules dendritiques sur l'induction de la commutation isotypique vers IgA, remettant en cause les données de la littérature. Nous avons donc choisi d'étudier l'implication des pDC sur la réponse IgA *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles murins transgéniques de déficience en pDC et avons analysé les conséquences d'une déplétion transitoire ou de longue durée des pDC sur la commutation isotypique vers IgA dans le GALT, la fréquence et le renouvellement des populations cellulaires impliquées dans la réponse IgA, et les niveaux d'IgA muqueux et systémiques.

Caractérisation de la réponse IgA hépatique

Suite à l'obtention de données préliminaires dans l'équipe d'accueil montrant que le foie contient une population significative de plasmocytes, dont plus de la moitié exprime IgA, l'objectif principal de ma thèse a été caractériser ces acteurs de la réponse IgA, de déterminer leur origine et leurs fonctions. Pour cela, nous avons :

- Réalisé une caractérisation phénotypique extensive des populations de lymphocytes B et de plasmocytes dans le foie murin et humain ;
- Étudié si le foie constitue un site inducteur et/ou effecteur de la réponse IgA à l'homéostasie et après immunisation orale ;
- Déterminé l'origine des précurseurs des cellules produisant les IgA dans le foie ;
- Recherché la cible des IgA produites par les plasmocytes hépatiques ;
- Étudié l'impact de la consommation chronique d'alcool sur la réponse IgA hépatique.

RESULTATS - PUBLICATION n°1

« Plasmacytoid dendritic cells are dispensable for non-infectious intestinal IgA responses *in vivo*. »

Ludovic Moro-Sibilot, Sébastien This, Pascal Blanc, Amélien Sanlaville, Vanja Sisirak, Emilie Bardel, Gilles Boschetti, Nathalie Bendriss-Vermare, Thierry Defrance, Bertrand Dubois & Dominique Kaiserlian.

Manuscrit accepté, sous presse dans *The European Journal of Immunology*

Les cellules dendritiques de l'intestin régulent l'homéostasie immunitaire intestinale en restreignant les réponses T pro-inflammatoires et en induisant la production d'IgA. Néanmoins, aucun sous-type de cellules dendritiques n'a encore été strictement assigné à cette dernière fonction, mêmes si quelques candidats semblent émerger. En particulier, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), notoirement impliquées dans l'orchestration de l'immunité antivirale et l'induction de la tolérance T envers des antigènes oraux, ont été récemment impliquées dans l'initiation d'une réponse IgA lors d'une infection virale intestinale et la génération *in vitro* de cellules productrices d'IgA à partir de lymphocytes B naïfs sans nécessiter de stimulus microbien ou l'aide de lymphocytes T.

Cette étude démontre, grâce à l'utilisation de deux modèles murins transgéniques, que la déplétion des pDC sur une courte ou une longue période de temps n'altère ni la commutation isotypique vers IgA dans les plaques de Peyer, ni le nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA dans la muqueuse intestinale à l'homéostasie. De plus, les pDC ne sont pas nécessaires à l'induction d'une réponse effectrice à IgA dans l'intestin suite à l'immunisation orale avec un antigène thymo-dépendant ou thymo-indépendant, et ne contribuent pas à l'activation précoce des lymphocytes B spécifiques de l'antigène et la commutation isotypique vers IgA dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin.

Ces résultats montrent que les pDC ne sont pas nécessaires pour la mise en place de réponses IgA dans des conditions non-infectieuses, suggérant que plusieurs sous-types de cellules dendritiques sont certainement impliqués de façon redondante dans le contrôle de la réponse IgA intestinale.

Plasmacytoid Dendritic Cells Are Dispensable For Non-Infectious Intestinal IgA Responses *in vivo*.

Ludovic Moro-Sibilot¹⁻⁵, Sebastien This¹⁻⁵, Pascal Blanc¹⁻⁵, Amelien Sanlaville¹⁻⁶, Vanja Sisirak⁷, Emilie Bardel¹⁻⁵, Gilles Boschetti¹⁻⁵, Nathalie Bendriss-Vermare⁸, Thierry Defrance¹⁻⁵, Bertrand Dubois^{1-6*} and Dominique Kaiserlian^{1-5*}.

¹International Center for Infectiology Research (CIRI), LYON, FR. ²Inserm U1111, LYON, FR. ³CNRS UMR5308, LYON, FR. ⁴Ecole Normale Supérieure, LYON, FR. ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, LYON, FR. ⁶Present address: Cancerology Research Center of Lyon, Inserm U1052 – CNRS UMR5286, LYON, FR. ⁷Dept. of Pathology, Dept of Medicine, NYU Langone Medical Center, MSB 507, New York, USA. ⁸Cancerology Research Center of Lyon, Inserm U1052 – CNRS UMR5286, LYON, FR.

*Equal contributors

Keywords:

Plasmacytoid dendritic cells; IgA; plasma cells; intestinal homeostasis; oral immunization.

Abbreviations:

DT – diphtheria toxin; DTR – diphtheria toxin receptor; FCM – flow cytometry; PC – plasma cells; pDC – plasmacytoid dendritic cells; QM – Quasi-Monoclonal; SI – small intestine; TI – T cell-independent; TD – T cell-dependent; Treg – regulatory T cell.

Corresponding authors:

Dominique Kaiserlian (main corresponding author)
Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
21, avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07
FRANCE
Tel: +33 (0)4 37 28 23 96
Fax: +33 (0)4 37 28 23 41
dominique.kaiserlian@inserm.fr

Bertrand Dubois
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard
28, rue Laennec - 69373 LYON cedex 08
FRANCE
Tel: +33 (0)4 78 78 28 53
Fax: +33 (0)4 78 78 27 20
bertrand.dubois@lyon.unicancer.fr

(3496 words)

Abstract

Intestinal dendritic cells (DCs) orchestrate gut immune homeostasis by dampening pro-inflammatory T-cell responses and inducing anti-inflammatory IgA responses. Although no specific DC subset has been strictly assigned so far to govern IgA response, some candidate subsets emerge. In particular, plasmacytoid DCs (pDCs), which notoriously promote anti-viral immunity and T-cell tolerance to innocuous antigens (Ags), contribute to IgA induction in response to intestinal viral infection and promote T-cell-independent IgA responses *in vitro*. Here, using two transgenic mouse models, we show that neither short-term nor long term pDC depletion alters IgA class switch recombination in Peyer's patches and frequency of IgA plasma cells in intestinal mucosa at steady state, even in the absence of T-cell help. In addition, pDCs are dispensable for induction of intestinal IgA plasma cells in response to oral immunization with T-cell-dependent or T-cell-independent Ags, and are not required for proliferation and IgA switch of Ag-specific B cells in GALT. These results show that pDCs are dispensable for non-infectious IgA responses, and suggest that various DC subsets may play redundant roles in the control of intestinal IgA responses.

Introduction

The gut shelters the largest plasma cell (PC) population of the body, which produce almost exclusively IgA [1]. Along with suppression of pro-inflammatory intestinal T-cell responses (i.e. oral tolerance), IgA support gut homeostasis by maintaining a diverse microbiota [2] and ensuring immune exclusion of pathogenic microbes [3]. Peyer's patches (PP) are the major inductive site for B cell activation and IgA class switch recombination (CSR) in response to T-cell dependent (TD) and T-cell independent (TI) intestinal Ags [4]. Pioneer *in vitro* work from Spalding and Cebra has suggested that dendritic cells (DCs) from PP critically contribute to IgA CSR [5, 6]. Intestinal DCs, including conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), which are both critical for oral tolerance [7, 8], have been proposed to contribute to the IgA response [9, 10]. Indeed, it is now well established that several DC subsets produce critical factors for IgA CSR and B-cell differentiation, but also for survival and gut homing of IgA PCs. More specifically, CX3CR1⁺ and CD103⁺ CD11c⁺ gut resident cDC subsets can stimulate TD IgA production through IL-6 and retinoic acid in response to TLR ligands and factors produced by epithelial cells [11]. Additionally, TNF/iNOS-producing DCs (TipDCs) can promote TI IgA response by producing BAFF and APRIL, in response to TLR ligands [12].

Transgenic mice with human diphtheria toxin receptor (DTR) expression under the control of CD11c [13] or BDCA2 [14] promoter constitute unique tools to address the functional relevance of DC subsets in the IgA response *in vivo*. Indeed, conditional ablation of cDCs in CD11c-DTR mice has revealed that CD11c⁺ DC are required for induction of intestinal IgA response against a TD Ag (*i.e.* cholera toxin) delivered orally [9], but are dispensable for antibody responses after systemic immunization with the model TI type 2 Ag NP-Ficoll [15]. This suggests that cells other than cDCs, possibly pDCs, might contribute to B cell priming to TI Ags. In addition, the use of anti-pDC antibodies and BDCA2-DTR mice recently revealed that pDCs contribute to IgA responses against intestinal rotavirus infection via their production of type-I IFN [16]. Yet, whether pDCs are essential for intestinal IgA responses against endogenous or exogenous intestinal Ags in a non-infectious context remains largely unexplored. Interestingly, a recent study documented that pDCs from mesenteric lymph nodes (mLN) and PP were highly efficient in promoting IgA CSR *in vitro* independently of any T cell or microbial stimulus, via expression of membrane-bound BAFF and APRIL [10]. In the present study, we used BDCA2-DTR mice [14] as well as CD11c^{Cre}E2-2^{flox} mice [17] to directly address whether pDCs play a crucial role for intestinal IgA responses *in vivo*. We show here that pDCs are dispensable for IgA CSR and differentiation of B cells into IgA PCs, both at steady state and in response to oral immunization with TD or TI Ags.

Results and Discussion

Steady state IgA responses are maintained in pDC-depleted mice.

At steady state, numerous B cells are activated and proliferate in PP in response to gut-derived TD and TI Ags, and preferentially undergo IgA CSR due to the particular cellular and intestinal cytokine microenvironment. IgA switched B cells subsequently further differentiate upon migration to mLN and homing to the small intestine *Lamina Propria* (SI LP), leading to mature IgA PCs, secreting high amount of IgA. Each of these steps is finely controlled and can be altered by the absence of a particular cytokine or cell population, as demonstrated in TGF- β receptor deficient [18] and Treg depleted mice [19].

To investigate if pDCs are critically required for intestinal IgA responses at steady state, we used two transgenic mouse models allowing for transient (BDCA2-DTR mice) or constitutive (CD11c^{Cre}E2-2^{flox} mice) selective depletion of pDCs. pDCs, identified as Siglec-H⁺CD11c^{int} cells, were efficiently depleted in SI LP, PP, spleen and mLN of BDCA2-DTR mice as soon as 24h after the first DT injection (data not shown), and remained depleted over one week (Figure 1A). As expected, CD11c^{Cre}E2-2^{flox} mice had a profound pDC defect in lymphoid organs and SI LP (Figure 1B). Importantly, imaging cytometry revealed that the few remaining dots in the pDC gate of depleted mice most likely corresponded to auto-fluorescent/dying cells rather than *bona fide* pDCs (Supporting Information Figure 1).

In both models, IgA titration in SI wash, serum, bile (which is an IgA-enriched fluid [20]) and fecal extract revealed that pDC-depletion did not alter the level of IgA in these fluids (Figure 1C-D). We also used flow cytometry (FCM) to quantify IgA PCs, identified as intra-cytoplasmic (ic) IgA^{high} cells (Figure 1E-F, upper panels). As expected for PCs, these cells were CD138⁺Ly6C⁺B220^{low/-}CD19^{low} (Supporting Information Figure 2), except in the SI LP where the CD138 marker could not be detected due to its degradation during enzymatic digestion (*data not shown*). pDC-depletion affected neither the important contingent of IgA PC in the SI LP (Figure 1E-F), nor the small amount of IgA PCs/plasmablasts in PP, mLN and spleen (Supporting Information Figure 3A-B). Additionally, B-cell activation/expansion and IgA CSR at steady state appeared largely independent of pDCs, as similar populations of germinal center (CD95⁺GL7⁺ - Supporting Information Figure 3C-D) and switched IgA⁺ (icIgA^{int}CD19⁺ - Figure 1E-F, lower panels) B cells were observed in PP of pDC-depleted and control mice.

Because part of the intestinal IgA response is T-cell independent and pDCs were proposed to promote TI IgA CSR *in vitro* via their specific expression of membrane-bound BAFF and APRIL [10], we investigated the outcome of pDC-depletion in mice treated with anti-CD4 mAb. Anti-CD4 mAb injection successfully depleted CD4⁺ T cells in all lymphoid organs and SI LP (Supporting Information Figure 4A), and caused a major drop of IgA in intestinal fluid, serum and bile (Figure

1G), and of SI LP IgA PCs and PP IgA-switched B cells (Figure 1H). Interestingly, such residual steady state IgA responses in anti-CD4 treated BDCA2-DTR mice were unaffected by DT-induced depletion of pDCs (Figure 1G-H & Supporting Information Figure 4B). Thus, while the global IgA response is dramatically reduced in the absence of CD4⁺ T cells, the remaining TI IgA response is not affected by pDC-depletion. In addition, we found that membranous expression of BAFF and APRIL was clearly not restricted to GALT pDCs, as both cytokines could also be detected on a fraction of cDCs and myeloid cells in mLN and spleen (Supporting Information Figure 5A-B). Moreover, systemic BAFF levels were unaffected by the constitutive lack of pDCs (Supporting Information Figure 5C). Taken together, these data indicate that transient or constitutive absence of pDCs in normal or T-cell deficient mice does impact neither IgA CSR in GALT nor the size of the IgA PCs contingent in the SI LP.

Induction of IgA responses to TD or TI Ags is independent of pDC.

To assess if pDCs are essential for the induction of an Ag-specific IgA response against TD or TI Ags, BDCA2-DTR mice (Figure 2A-B) and CD11c^{Cre}E2-2^{flox} mice (Figure 2C-D) were orally immunized with both NP-Ficoll (TI Ag) and cholera toxin (CT, TD Ag). Seven days later, each Ag-specific IgA response was measured by ELISpot (for direct quantification of Ag-specific IgA secreting cells) and by ELISA. Because NP sometimes gives relatively high background in ELISA, we compared Ficoll vs NP-Ficoll immunized mice and detected NP-reactive Ab only in the latter (*data not shown*). Both types of pDC-deficient mice and their respective control littermates developed similar primary Ag-specific IgA responses to CT (Figure 2A and C – PRIME) and to NP-Ficoll (Figure 2B, D), both in terms of Ab titers and frequency of IgA PCs. In addition, the response to a booster oral CT immunization was also not modified by absence of pDCs (Figure 2C – BOOST). These results demonstrate that IgA responses to an orally delivered TI or TD Ag do not require pDCs.

pDC are not required for early B cell activation and IgA CSR after oral immunization with a TI Ag

To further investigate the requirement of pDC in TI IgA responses, we analyzed the impact of pDC-depletion on B-cell priming and IgA CSR *in vivo* after oral immunization with the model TI Ag NP-Ficoll. To track NP-specific B cells, BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} (Ly5.1⁺Ly5.2⁺) recipients were transferred with pDC-depleted B cells from QM mice (Ly5.2⁺) before oral immunization with NP-Ficoll (Figure 3A). No dividing QM B cells were detected in non-immunized or Ficoll immunized mice (Supporting Information Figure 6). On day 4 after immunization with NP-Ficoll, proliferating NP-specific B cells were detected in spleen, mLN and PP, and pDC-depletion affected neither the frequency of dividing cells nor the number of cell divisions (Figure 3B). Surface IgA was detected on NP-specific donor B cells selectively in PP, but not in spleen or mLN of BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} mice or WT

littermates (Figure 3C), confirming that PP are the major IgA inductive site in response to oral Ags. Such IgA switched NP-specific B cells were recovered in equal proportion, and had undergone a similar number of divisions (Figure 3C-D) irrespective of pDC-depletion, supporting that the absence of pDC does not alter oral Ag induced B-cell proliferation and subsequent IgA isotype switching. This indicates that pDCs are not essential for B-cell expansion, IgA CSR and subsequent differentiation into PC in response to oral immunization with a TI Ag.

Concluding remarks

Our data demonstrate that neither transient nor constitutive pDC-depletion alters IgA responses *in vivo*. In particular, despite their documented ability to induce IgA CSR *in vitro* independently of T-cell help [10], pDCs are dispensable *in vivo* for B cell activation, IgA CSR and IgA PC differentiation both at steady state in CD4⁺ T-cell deficient mice and following oral immunization with a TI Ag. We thus propose that, at variance with their prominent role in cognate IgA responses against enteric viral infection [10, 16], pDCs might exert redundant functions with other DC subsets [11, 12] in non-infectious IgA responses.

Materials and methods

Mice

BDCA2-DTR Tg mice (C57BL/6 background), carrying the DT receptor under control of the human pDC BDCA2 (CLEC4C) promoter [14], were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). CD11c-Cre⁺E2-2^{-fl} mice (CD11c^{Cre}E2-2^{flox}) and their WT CD11c-Cre⁻E2-2^{+fl} littermates were obtained by crossing E2-2^{+/-} mice (129SV background) with E2-2^{fl/fl}CD11c-Cre^{+/-} mice (C57BL/6 background) as described [17]. In CD11c^{Cre}E2-2^{flox} mice, the development of pDCs is inhibited from birth due to the selective absence of the E2-2 transcription factor in DCs. Quasi-Monoclonal (QM) mice [21], carrying a hemizygous rearranged V(D)J heavy chain segment specific for NP, were kindly provided by M. Cascalho (Ann Arbor, MI, USA). Ly5.1 (C57BL/6-Ly5.1) mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). All mice were bred under specific pathogen-free conditions and protocols were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15) in accordance with the European guidelines for animal experiments.

In-vivo treatments

To deplete pDCs, BDCA2-DTR mice were injected i.p. with 20ng/g of DT (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) on day 0 (or day -1 for oral immunization), then every other day with 10ng/g. DT-treated WT littermates were used as controls. To deplete CD4⁺ T cells, BDCA2-DTR mice were injected i.p. with 4μg/g anti-CD4 GK1.5 (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) at day -7 and then with 0.8μg/g every three days. Mice treated with rat IgG2b (BioXCell) were used as controls. CD4⁺ T cell depletion was controlled in blood at day 0 before starting DT treatment and at sacrifice.

Oral immunization and in vivo tracking of Ag-specific B cells

Mice were orally immunized once with 5mg NP₇₇-AECM-FICOLL (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) and 10μg CT (List Biological Laboratories) in NaHCO₃ 0.2M, pH8.3. In some experiments, mice received a booster immunization with CT at day 14 after primary immunization. For adoptive transfer experiments, spleen cells from QM mice (Ly5.2⁺) were enriched for B cells by negative selection using CD4-PE, CD8-PE, CD49b-PE, Gr1-PE (BD Pharmingen, Pont de Claix, France) and SiglecH-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA) antibodies, anti-PE magnetic beads and LD columns (Miltenyi Biotech, Paris, France). Enriched B cells, containing >85% CD19⁺ cells and <0.01% pDC, were stained with CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and were adoptively transferred i.v. (2.5.10⁶) into BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} F1 recipients (Ly5.1⁺Ly5.2⁺) to follow NP-specific B-cell proliferation and differentiation. WT littermates (BDCA2-DTR^{-/-}Ly5.1^{+/-}) were used as controls.

Acknowledgements

We thank Marion Chevandier and Claire Macari for technical assistance, Laurent Genestier, Morgan Taillardet and Olivier Thaumat for helpful discussions and advice, Thibault Andrieu and Sebastien Dussurgey (Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444) for expert technical assistance. We also thank the animal core facilities PBES (ENS Lyon, SFR BioSciences Gerland UMS3444) and AniCan (Cancer Research Center of Lyon) for breeding and screening transgenic mice. Ludovic Moro-Sibilot was supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140930972).

Conflicts of interest

The authors have no conflicting interests to disclose.

References

1. **Brandtzaeg P, Johansen F-E.** Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005; **206**:32–63.DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x.
2. **Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, et al.** Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity.* 2014; **41**:152–165.DOI: 10.1016/j.immuni.2014.05.016.
3. **Macpherson AJ, Slack E.** The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007; **23**:673–678.DOI: 10.1097/MOG.0b013e3282f0d012.
4. **Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P.** The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology.* 2008; **1**:11–22.DOI: 10.1038/mi.2007.6.
5. **Craig SW, Cebra JJ.** Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med.* 1971; **134**:188–200.
6. **Spalding DM, Williamson SI, Koopman WJ, McGhee JR.** Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J Exp Med.* 1984; **160**:941–946.
7. **Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, et al.** Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006; **203**:519–527.DOI: 10.1084/jem.20052016.
8. **Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, Trinchieri G, et al.** Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity.* 2008; **29**:464–475.DOI: 10.1016/j.immuni.2008.06.017.
9. **Fahlén-Yrlid L, Gustafsson T, Westlund J, Holmberg A, Strömbeck A, Blomquist M, MacPherson GG, et al.** CD11c(high) dendritic cells are essential for activation of CD4+ T cells and generation of specific antibodies following mucosal immunization. *The Journal of Immunology.* 2009; **183**:5032–5041.DOI: 10.4049/jimmunol.0803992.
10. **Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, Ohteki T.** Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity.* 2011; **34**:247–257.DOI: 10.1016/j.immuni.2011.02.002.
11. **Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, Sato S, et al.** Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008; **9**:769–776.DOI: 10.1038/ni.1622.
12. **Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, et al.** Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature.* 2007; **448**:929–933.DOI: 10.1038/nature06033.
13. **Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, et al.** In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 2002; **17**:211–220.
14. **Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M.** Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8+ T Cell Accrual. *Immunity.* 2010; **33**:955–966.DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.020.
15. **Hebel K, Griewank K, Inamine A, Chang H-D, Müller-Hilke B, Fillatreau S, Manz RA, et al.** Plasma cell differentiation in T-independent type 2 immune responses is independent of CD11c(high) dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2006; **36**:2912–2919.DOI: 10.1002/eji.200636356.

16. **Deal EM, Lahl K, Narváez CF, Butcher EC, Greenberg HB.** Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest.* 2013; **123**:2464–2474.DOI: 10.1172/JCI60945.
17. **Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, Holmberg D, et al.** Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell.* 2008; **135**:37–48.DOI: 10.1016/j.cell.2008.09.016.
18. **Cazac BB, Roes J.** TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity.* 2000; **13**:443–451.
19. **Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO.** A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009; **106**:19256–19261.DOI: 10.1073/pnas.0812681106.
20. **Delacroix DL, Malburny GN, Vaerman JP.** Hepatobiliary transport of plasma IgA in the mouse: contribution to clearance of intravascular IgA. *Eur J Immunol.* 1985; **15**:893–899.DOI: 10.1002/eji.1830150906.
21. **Cascalho M, Ma A, Lee S, Masat L, Wabl M.** A quasi-monoclonal mouse. *Science.* 1996; **272**:1649–1652.

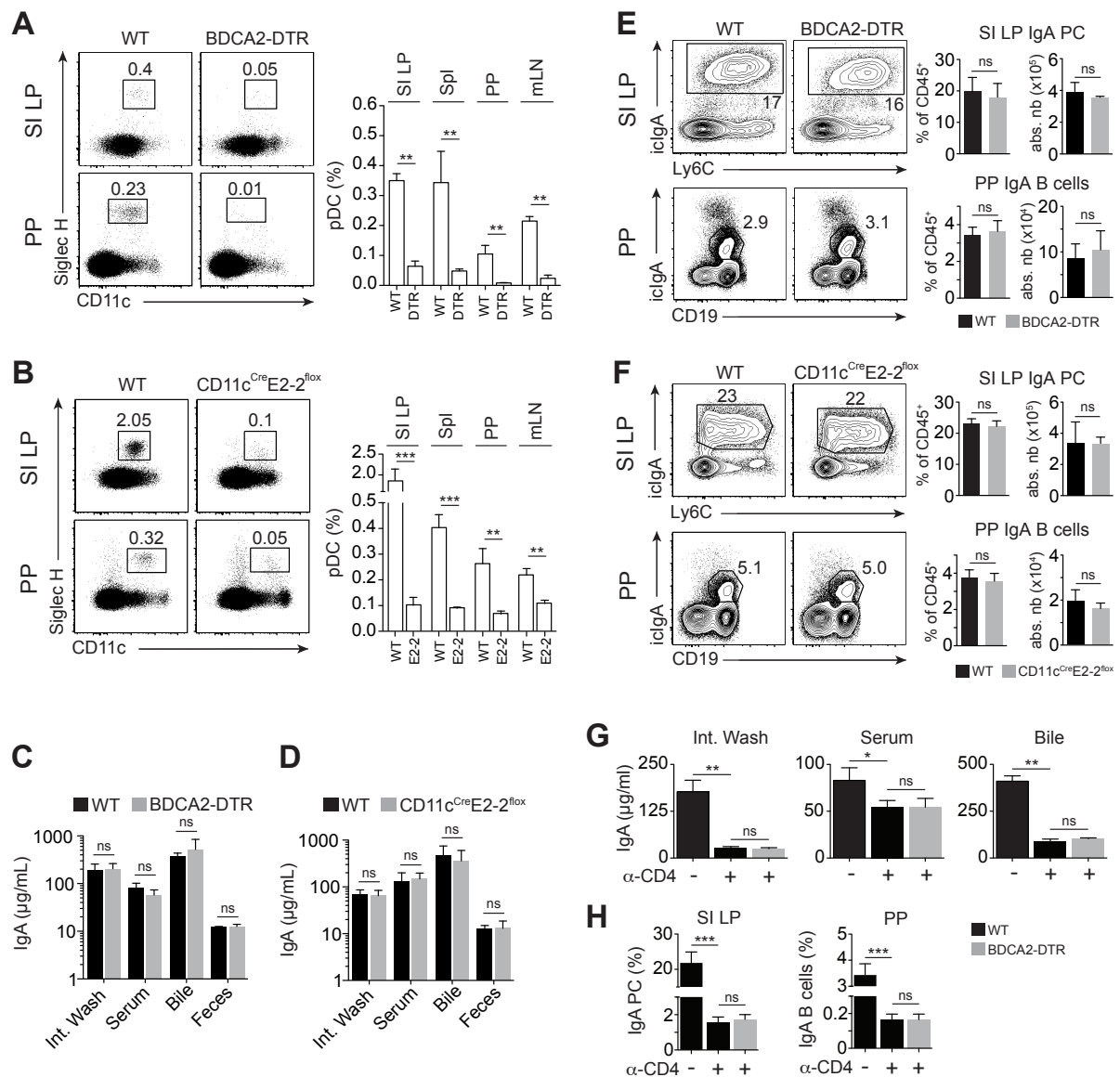


Figure 1.

Steady state IgA responses are maintained after transient or permanent depletion of pDC.

(A-B) FCM analysis showing the frequency of pDCs (SiglecH⁺CD11c^{int}) among total CD45⁺ cells in SI LP (prepared by enzymatic digestion after removal of intra-epithelial lymphocytes) and PP of (A) BDCA2-DTR mice at day 7 after the first DT injection or (B) CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice, and their respective WT littermates. Histogram plots show the mean frequency of pDCs in SI LP, spleen (Spl), PP and mLN. (C-D) ELISA titration of IgA in intestinal wash, serum, bile and fecal extract of BDCA2-DTR mice at day 7 after the first DT injection (C) and CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice (D). (E-F) Absolute numbers (abs. nb) and frequencies of IgA PCs (CD19^{low}Ly6C⁺icIgA⁺) among total CD45⁺ cells in SI LP, switched IgA B cells (CD19⁺B220⁺icIgA^{int}) among total CD45⁺ cells and GC B cells (CD95⁺GL7⁺) among total B cells (CD19⁺) in PP of either (E) BDCA2-DTR mice at day 7 after the first DT injection or (F) CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice, and their respective WT littermates. (G-H) BDCA2-DTR mice were depleted of CD4⁺ T cells from d-7 and treated or not with DT from d0 to d+6. All analyzes were performed on d+7. (G) ELISA titration of IgA in intestinal wash, serum and bile of WT littermates (black bars) or BDCA2-DTR mice (grey bars) treated or not with CD4-depleting antibody. (H) Mean frequency of IgA PCs (CD19^{low}Ly6C⁺icIgA⁺) and IgA switched B cells (CD19⁺B220⁺IgA^{int}) among total CD45⁺ cells in SI LP and PP of WT littermates (black bars) or BDCA2-DTR mice (grey bars), treated or not with CD4-depleting antibody. (A-H) Data are shown as mean +SEM (n=8, A-F; n=5, G-H), and are representative of one out of two (B, D, F, G and H) or three (A, C and E) independent experiments. (ns: p>0.05, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005; (A-F) Unpaired *t* test, (G-H) Kruskal-Wallis test).

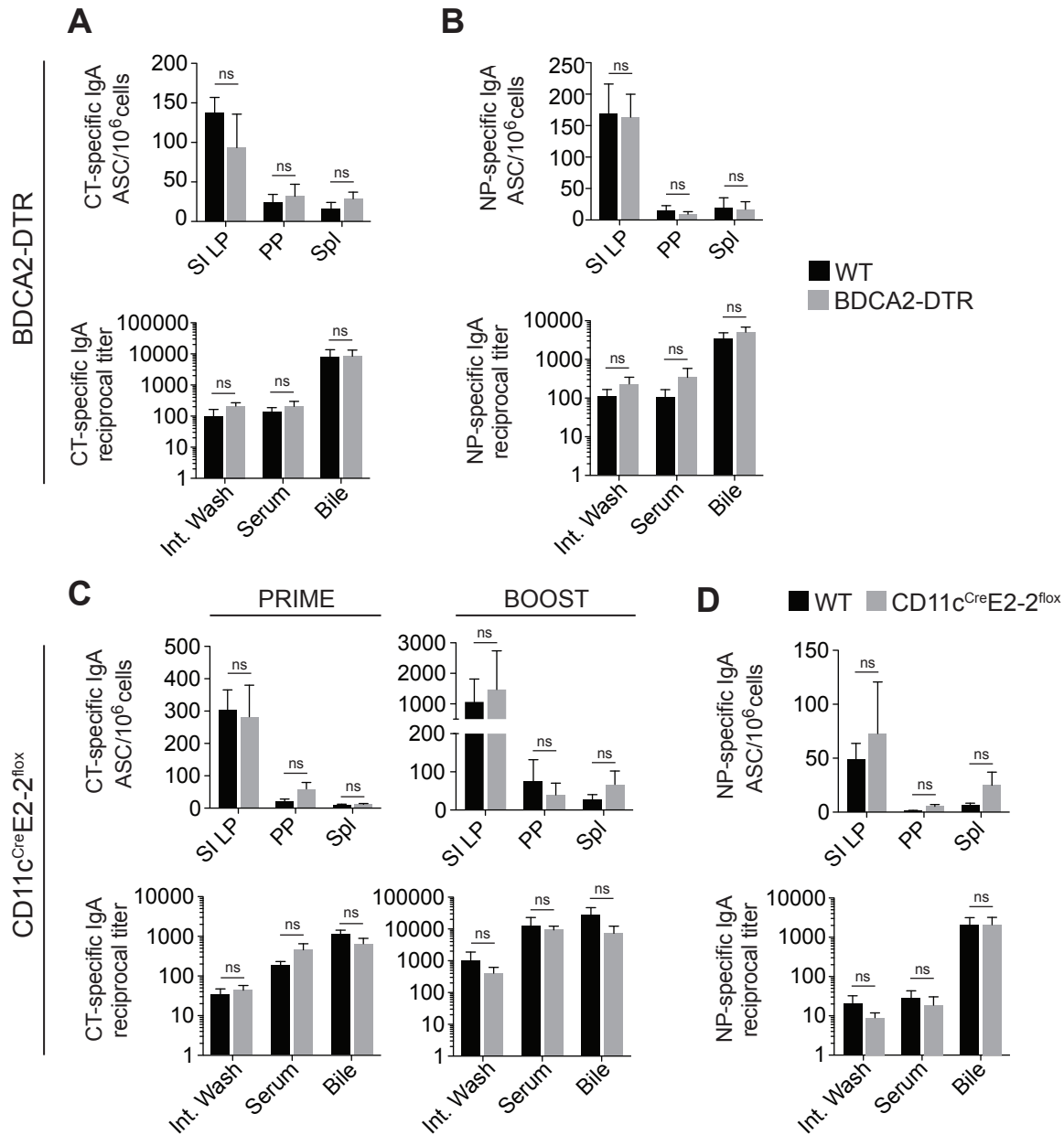


Figure 2.

pDC are dispensable for induction of specific IgA antibodies and IgA secreting cells in response to oral immunization with a TI or a TD Ag.

(A-D) Mice were immunized orally once with NP-Ficoll at day 0 or twice with CT at day 0 and day 14. Primary NP- and CT-specific responses were analyzed at day 7 and boosted CT-specific response was analyzed on day 21. CT-specific (A, C) and NP-specific (B, D) IgA responses in (A, B) DT-treated BDCA2-DTR mice and (C, D) CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice (grey bars), and their respective WT littermates (black bars). Ag-specific IgA were measured by ELISA in intestinal wash, serum and bile while Ag-specific IgA Antibody Secreting Cells (ASCs) were analyzed by ELISpot in SI LP, PP and spleen. (C) The primary and secondary CT-specific responses were compared in the CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mouse model. (A-D) Data are shown as mean +SEM (n=6) and are representative of one out of two independent experiments. (ns: p>0.05; Unpaired *t* test).

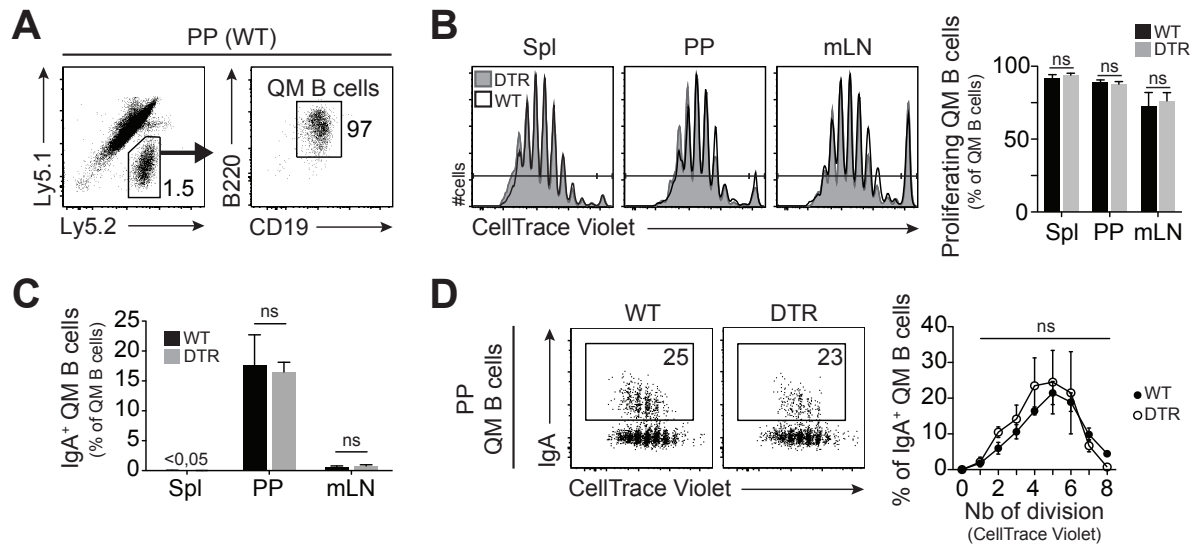
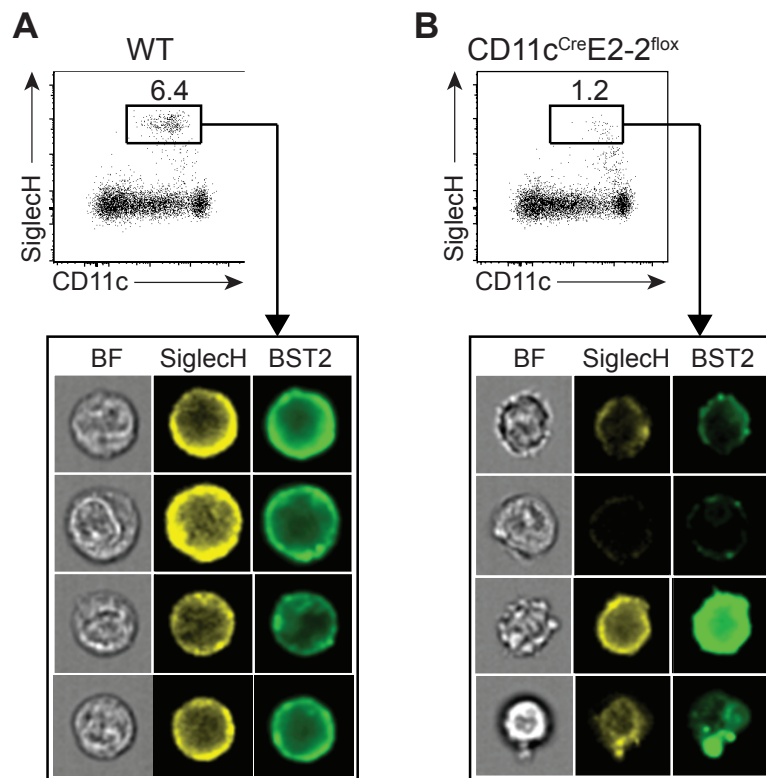


Figure 3.

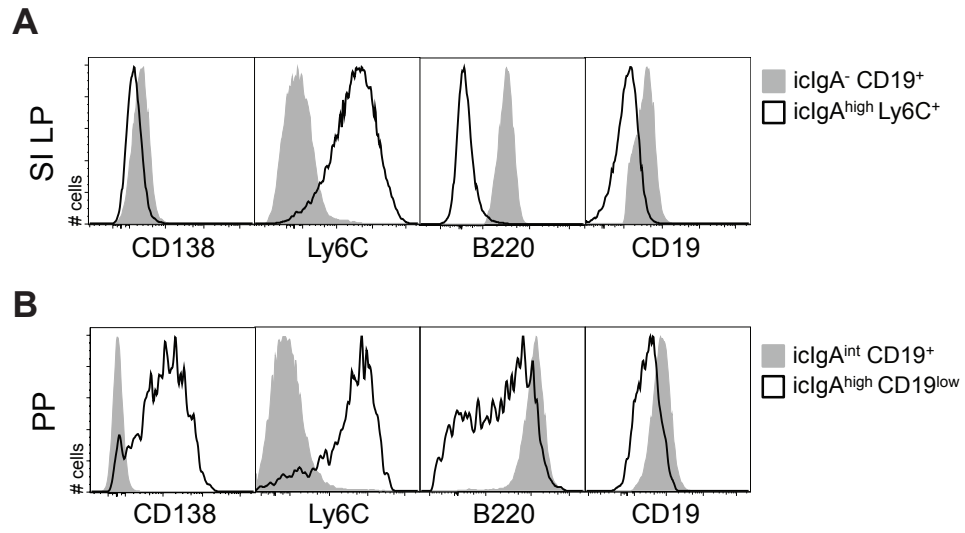
Proliferation and IgA CSR of NP-specific B cells induced by oral immunization with NP-Ficoll are independent of pDC.

(A-D) pDC-depleted enriched QM B cells were adoptively transferred into BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} and WT littermates before oral immunization with NP-Ficoll. Analyses were performed on d4 after transfer. (A) Identification of QM B cells (CD19⁺B220⁺) among donor cells (Ly5.1⁺Ly5.2⁺) by flow cytometry (the data presented correspond to PP of a WT littermate mouse). (B) FCM analysis of QM B-cell proliferation (Cell Trace Violet dilution) in spleen, PP and mLN of DT-treated BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} mice (grey filled histograms) and WT controls (black lined histograms). Graph shows the percentage of proliferating QM B cells among total QM B cells in these mice. (C) Frequency of surface IgA⁺ B cells among QM B cells in spleen, PP and mLN of pDC-depleted BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} mice (grey bars) and WT controls (black bars). (D) Analysis of IgA expression in dividing QM B cells. Graph shows the mean frequency of IgA⁺ B cells among total QM B cells, for each division state, in pDC-depleted BDCA2-DTR^{+/-}Ly5.1^{+/-} mice (white dots) and WT controls (black dots). (B, C and D) Data are shown as mean +S.E.M (n=6). (A-D) Data are representative of one out of two independent experiments. (ns: p>0.05; Unpaired *t* test).



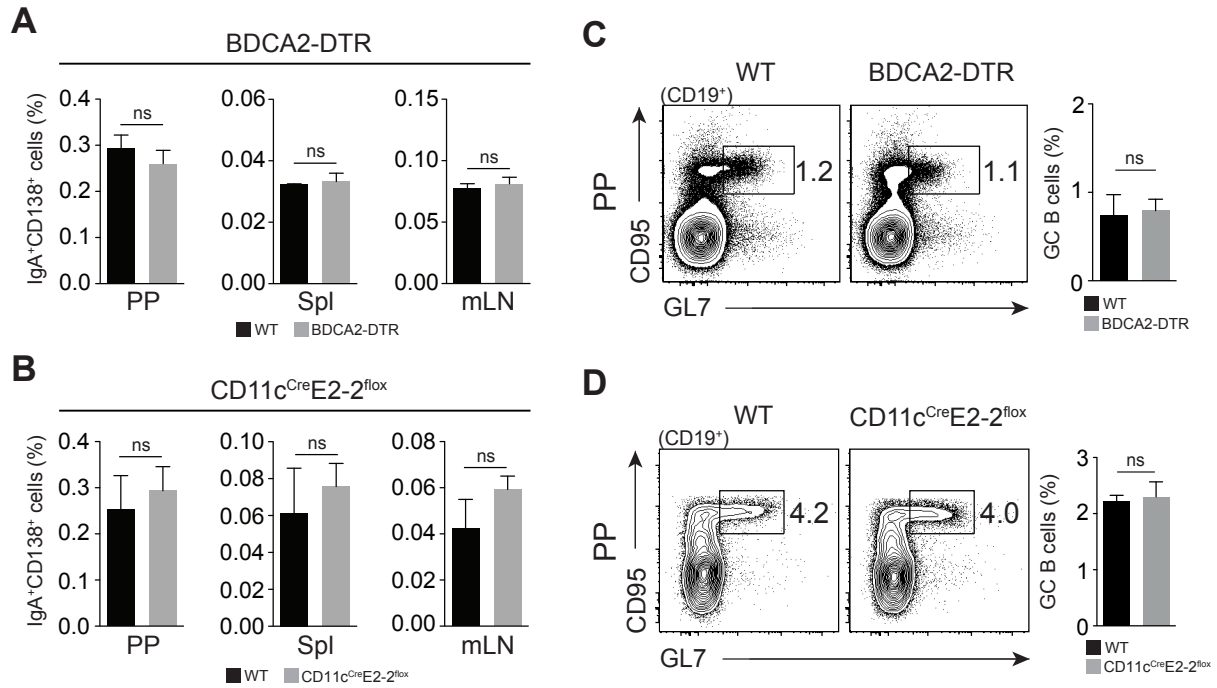
Supplemental Figure 1.

Remaining SiglecH⁺CD11c^{int} cells in CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice are mostly autofluorescent/dying cells. Imaging cytometry analysis of SiglecH⁺CD11c^{int} cells among viable CD45⁺CD19⁻CD3ε⁻NKp46⁻ cells in spleen of **(A)** WT littermates (CD11c-Cre⁺E2-2^{+/fl}) and **(B)** CD11c-Cre⁺E2-2^{-/fl} mice. Gated events were analyzed for morphology (BF: brightfield) and for expression of the two pDC markers SiglecH and BST2.



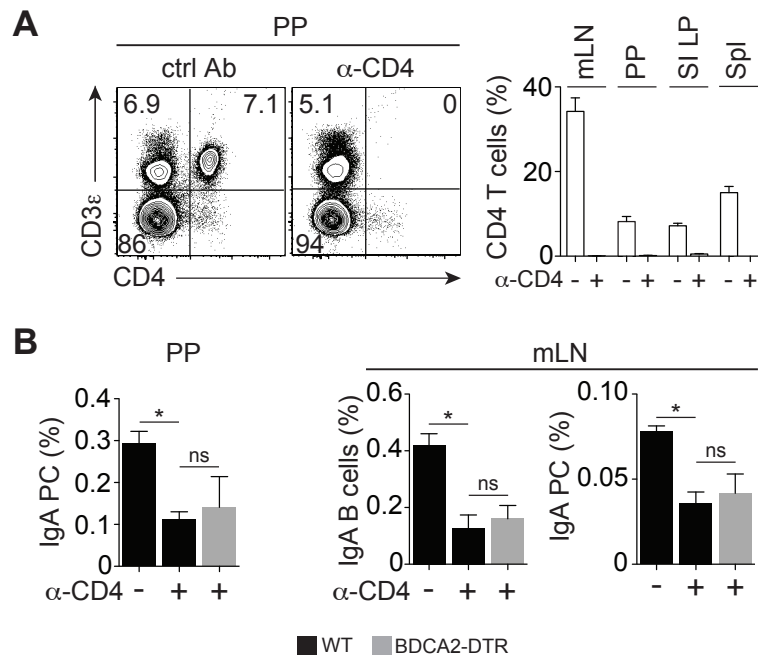
Supplemental Figure 2.

iclgA^{high} cells in SI LP and PP are plasma cells. Flow cytometry analysis of CD138, Ly6C, B220 and CD19 expression on CD45⁺iclgA^{high} cells (white histograms) from **(A)** SI LP and **(B)** PP, respectively compared to non-IgA B cells (iclgA⁻CD19⁺) or switched IgA B cells (iclgA^{int}CD19⁺) (grey histograms).



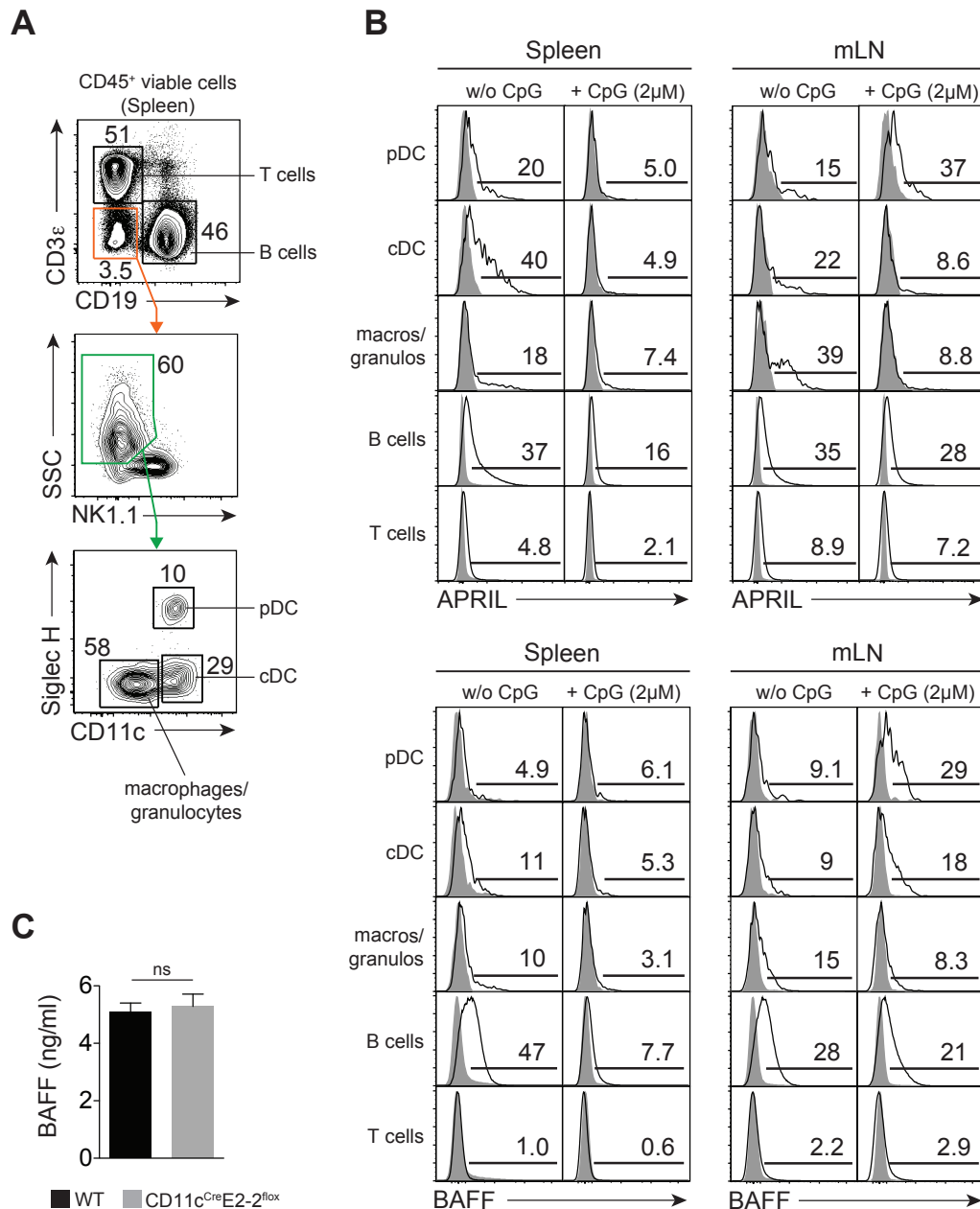
Supplemental Figure 3.

PP, spleen and mLN IgA plasma cells and PP GC B cells are not modified in pDC-deficient mice. (A-B) Mean frequency (\pm S.E.M) of IgA plasma cells (CD45⁺IClgA^{high}CD138⁺) in PP, spleen and mLN of (A) DT-treated BDCA2-DTR mice and (B) CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice, compared to their respective WT littermates. (C-D) Mean frequency (\pm S.E.M) of germinal center (GC) B cells (CD19⁺CD95⁺GL7⁺) in PP of (C) DT-treated BDCA2-DTR mice and (D) CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice, compared to their respective WT littermates (histograms show frequency among total CD45⁺ cells). Unpaired *t* test (n=8), ns: *p*>0.05. Data are representative of one out of two (B, D) or three (A, C) independent experiments.



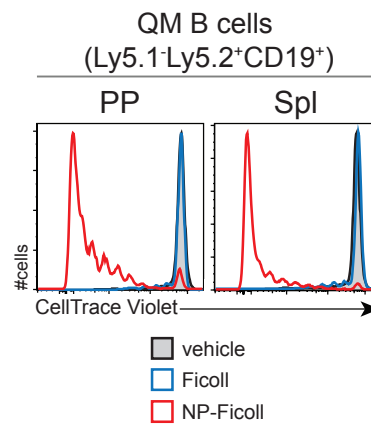
Supplemental Figure 4.

pDC depletion alters neither PP IgA plasma cells nor mLN IgA B cells and plasma cells in T-cell deficient condition. BDCA2-DTR mice were depleted of CD4⁺ T cells from d-7 and DT treatment started on d0. All analyzes were performed on d+7. **(A)** Frequency of CD4⁺ T cells (CD3 ϵ ⁺CD4⁺) among total CD45⁺ cells in PP of GK1.5 treated BDCA2-DTR mice and control mice treated with control antibody (ctrl Ab – rat IgG2b). Histograms show CD4⁺ T cells frequency among total CD45⁺ cells in mLN, PP, SI LP and spleen of these mice. **(B)** Mean frequency (\pm S.E.M) of IgA plasma cells (CD45⁺icIgA^{high}CD138⁺) in PP, and IgA B cells (CD45⁺CD19⁺icIgA^{int}) and plasma cells in mLN of CD4-depleted and DT-treated BDCA2-DTR mice, compared to their respective WT littermates, either depleted or not for CD4⁺ T cells. One Way ANOVA (n=5), ns: p>0.05, *p<0.05. Data are representative of one out of two independent experiments.



Supplemental Figure 5.

Expression of membrane-bound APRIL and BAFF is not restricted to pDCs and systemic BAFF levels are not modified by depletion of pDCs. (A-B) Spleen and mesenteric lymph nodes cells from C57BL/6 mice, incubated for 16 hrs with or without CpG-ODN1668 (2 μ M) and analyzed for membranous expression of APRIL and BAFF by FCM. (A) Gating strategy allowing identification of T cells (CD45⁺CD3 ϵ ⁺CD19⁻), B cells (CD45⁺CD19⁺CD3 ϵ ⁻), conventional dendritic cells (CD45⁺CD3 ϵ ⁺CD19⁻NK1.1⁻CD11c⁺SiglecH⁻), plasmacytoid dendritic cells (CD45⁺CD3 ϵ ⁺CD19⁻NK1.1⁻CD11c⁺SiglecH⁺) and “macrophages/granulocytes” (CD45⁺CD3 ϵ ⁺CD19⁻NK1.1⁻CD11c⁺SiglecH⁻). (B) Membranous expression of APRIL (upper panels) and BAFF (lower panels) on spleen and mLN cell subsets, stimulated or not with CpG (black lines: APRIL/BAFF staining; grey histograms: isotype control). (C) BAFF levels in sera of pDC-deficient CD11c^{Cre}E2-2^{lox} mice (grey histogram) and WT littermates (black histogram) determined by ELISA. Unpaired *t* test (n=8), ns: p>0.05. These data are representative of 2 independent experiments.



Supplemental Figure 6.

Dividing QM B cells are only detected after NP-Ficoll immunization. Spleen cells from QM mice were stained with CellTrace Violet, adoptively transferred into Ly5.1 mice, and recipients were then gavaged with either buffer only (vehicle), 5mg Ficoll or 5mg NP-Ficoll. 6 days later, proliferation of QM B cells was assessed by flow cytometry (CellTrace Violet dilution) in PP and spleen.

RESULTATS - PUBLICATION n°2

« IgA plasma cells link the gut to the liver in normal and pathological situations. »

Ludovic Moro-Sibilot, Pascal Blanc, Morgan Taillardet, Emilie Bardel, Gilles Boschetti, Alexandra Traverse-Glehen, Thierry Defrance, Dominique Kaiserlian & Bertrand Dubois.

Manuscrit en révision pour *Gastroenterology*

Le foie reçoit constamment via la veine porte des antigènes alimentaires et des composés bactériens provenant de l'intestin, envers lesquels il maintient la tolérance immunitaire. Le concept d'axe entéro-hépatique a été initialement proposé suite à la description chez les patients cirrhotiques d'une élévation des IgA sériques dirigés contre des antigènes intestinaux. Cependant, la contribution du foie dans la réponse IgA reste mal comprise. L'objectif de cette étude est de caractériser et identifier l'origine de la réponse IgA hépatique à l'homéostasie ainsi qu'en contexte pathologique.

Nous avons utilisé la cytométrie en flux polychromatique et l'ELISpot afin d'analyser les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes B présents dans le foie humain et murin. Nous avons également eu recours à des modèles murins conventionnels et transgéniques afin d'étudier et de tracer *in vivo* les lymphocytes B spécifiques de l'antigène et les plasmocytes à IgA récemment activés à l'homéostasie, après immunisation orale, et dans un modèle d'hépatopathie induite par la consommation d'alcool.

A l'homéostasie, le foie de souris abrite une population importante de plasmablastes à IgA, provenant des plaques de Peyer et produisant des IgA capables de réagir avec les bactéries de la flore commensale. Le foie apparaît également comme un site effecteur de la réponse IgA spécifique suite à l'immunisation orale avec des antigènes de type thymo-dépendants ou thymo-indépendants. De plus, la consommation chronique d'éthanol entraîne une augmentation sélective des cellules productrices d'IgA dans le foie, en parallèle avec l'augmentation des IgA sériques et de l'apparition de dépôts d'IgA dans les sinusoides hépatiques. De façon intéressante, l'utilisation d'une drogue bloquant la sortie des plasmablastes à IgA des plaques de Peyer permet d'abroger la réponse IgA hépatique ainsi que les désordres liés aux IgA, et améliore la pathologie du foie.

Le foie constitue donc un site effecteur alternatif de la réponse IgA, pouvant contribuer à maintenir l'homéostasie locale et la protection contre les infections.

IgA plasma cells link the gut to the liver in normal and pathological situations

Ludovic Moro-Sibilot¹⁻⁵, Pascal Blanc¹⁻⁵, Morgan Taillardet¹⁻⁵, Emilie Bardel¹⁻⁵, Gilles Boschetti¹⁻⁵, Alexandra Traverse-Glehen⁶, Thierry Defrance¹⁻⁵, Dominique Kaiserlian^{1-5*} and Bertrand Dubois^{1-5,7*}.

¹International Center for Infectiology Research (CIRI), LYON, FR. ²Inserm U1111, LYON, FR. ³CNRS UMR5308, LYON, FR.

⁴Ecole Normale Supérieure, LYON, FR. ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, LYON, FR. ⁶Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, LYON, FR. ⁷Present address: Cancerology Research Center of Lyon, Inserm U1052 – CNRS UMR5286, LYON, FR. *Equal contributors

Short title:

The liver is an effector site for intestinal IgA responses.

Abbreviations:

ALD – Alcoholic Liver Disease; BM – bone marrow; PB – plasmablast; PC – plasma cell; PP – Peyer's patch; QM – Quasi-Monoclonal; SI LP – small intestine *Lamina Propria*; TD – T cell-dependent; TI – T cell-independent.

Grant support:

Ludovic Moro-Sibilot was supported by a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140930972).

Corresponding authors:

Bertrand Dubois

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard
28, rue Laennec - 69373 LYON cedex 08

FRANCE

Tel: +33 (0)4 78 78 28 53

Fax: +33 (0)4 78 78 27 20

bertrand.dubois@lyon.unicancer.fr

Dominique Kaiserlian

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

21, avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07

FRANCE

Tel: +33 (0)4 37 28 23 96

Fax: +33 (0)4 37 28 23 41

dominique.kaiserlian@inserm.fr

Disclosure:

The authors have no conflicting interests to disclose.

Author contributions:

DK and BD supervised the study. LMS, DK and BD designed the study. TD provided critical advices and experimental tools. LMS, DK and BD wrote the manuscript. LMS, PB, MT, EB, GB and ATG performed the experiments and acquired the data. LMS, PB, MT, and BD analyzed the data.

(words: 6065)

Keywords:

Gut-liver axis; IgA; plasma cells; Alcoholic Liver Disease.

Abstract

Background and Aims. The liver constantly receives via the portal vein gut-derived dietary and microbiota components and maintains immune tolerance towards them. The concept of a gut-liver axis was initially introduced by description in cirrhotic patients of increased serum IgA against gut-derived Ag, but whether the liver actively contributes to the IgA response remains poorly understood. This study aimed to characterize and identify the origin of liver IgA B cell responses at steady state and in pathophysiological settings. **Methods.** Phenotypic and functional analyses of human and mouse liver B cells were carried out by flow cytometry and ELISpot. Normal and transgenic mouse models were used to trace Ag-specific B cells and recently-switched IgA plasma cells at steady state, after oral immunization, and in a model of alcohol-induced hepatitis. **Results.** At steady state, mouse liver featured a major enrichment in proliferative IgA plasmablasts, originating from Peyer's patches and efficiently producing IgA reactive to gut commensal bacteria. The liver also appeared as an effector site for IgA responses after oral immunization with T-dependent or T-independent Ags. Moreover, chronic ethanol feeding led to a selective increase of IgA-producing cells in the liver, which was associated with IgA disorders featuring enhanced serum IgA and IgA deposits in liver sinusoids. Interestingly, blocking IgA plasmablasts egress from Peyer's patches abrogated the hepatic IgA response and reduced IgA disorders and liver injury. **Conclusions.** The liver constitutes an alternative effector site for IgA responses that may contribute to maintenance of local homeostasis and protection against infection.

Introduction

Due to its unique vasculature system and anatomical localization, the liver receives the majority of blood supply from the gastro-intestinal tract through the portal vein, and thus faces continuous exposure to dietary antigens (Ag) and bacterial components. Besides its essential metabolic functions, the liver prevents systemic dissemination of gut-derived endotoxins and also appears essential for immune tolerance to intestinal Ags, a role long attributed solely to gut-associated lymphoid tissues (GALT). Gut homeostasis is maintained by induction of T cell tolerance and IgA production and relies on the presence of tolerogenic dendritic cells (DC), Tregs and immunosuppressive cytokines¹. Interestingly, the gut and the liver share such type of microenvironment prone to tolerance induction^{2,3}. Indeed, we recently showed that the liver is an early site for induction of oral tolerance to proteins and xenobiotics, thanks to rapid Ag uptake and presentation by plasmacytoid DC, which cause local anergy/deletion of Ag-specific T cells⁴. Yet, whether the liver also contributes to the intestinal IgA response remains unclear.

Intestinal IgA limit bacterial translocation and systemic dissemination, neutralize pathogenic microorganisms and associated toxins, and maintains diversity of the gut commensals⁵. Gut IgA plasma cells (PC) originate from B cells activated in GALT in response to T cell-dependent (TD) or -independent (TI) intestinal Ags. B cells massively expand in Peyer's patches (PP), undergo IgA class-switch recombination (CSR) and somatic hypermutations under the control of activation-induced (cytidine) deaminase (AID) and differentiate into plasmablasts (PB) producing high affinity (TD Ags) or low affinity "natural" (TI Ags) IgA⁶. PB then transit to mesenteric lymph nodes (mLN), where they receive domiciliation signals to home to the intestinal *Lamina Propria* (LP), and to a lesser extend in spleen and bone marrow (BM), where they further differentiate into antibody-producing PC.

The first link between the liver and intestinal humoral immunity was illustrated by the hepatobiliary transport of IgA, which clears circulating IgA and IgA immune complexes and fuels the duodenum with functional polymeric IgA via the bile⁷. That significant part of biliary IgA might originate from liver was suggested by the presence of Ig-secreting cells in rat liver parenchyma⁸ and human biliary epithelium⁹. Moreover, circulating IgA were proposed to contribute to endotoxin clearance in the liver mediated by Kupffer cells¹⁰. Interestingly, alcoholic liver disease (ALD), characterized by dysbiosis and increased intestinal permeability leading to abnormal bacterial translocation in portal circulation¹¹, is associated to increased serum IgA levels and liver IgA deposits¹². Yet, the origin of these IgA disorders and whether IgA could participate to liver damages remains poorly understood.

In this study, we show that the liver constitutes an effector site for IgA responses, as it hosts PB originating from PP and secreting IgA against gut commensal bacteria and orally delivered Ags.

Moreover, we document in a model of ALD that accumulation of IgA PB in the liver is linked to IgA disorders, and that liver injury is prevented by a drug blocking PP-derived IgA PB migration to the liver.

Results

Mouse liver shelters a significant population of IgA secreting cells.

FCM analysis showed that mouse liver non-parenchymal cells (LNPC) contained up to 20% of CD19⁺CD138⁻ B cells (Figure 1A), comprising primarily B220⁺CD11b⁻ B2 cells and a minor subset of B220⁺CD11b⁺ B1 cells, normally enriched in the peritoneal cavity (Figure 1B, left panel). The liver B2 cells included a majority of (CD23⁺CD21⁺) follicular B cells, very few (CD23⁻CD21⁻) transitional B cells and virtually no (CD23^{low}CD21^{high}) marginal zone-type B cells (Figure 1C). Most hepatic B cells were naïve IgD⁺IgM⁺ B cells, while <1% were switched IgA⁺ or IgG1⁺ B cells with a CD80⁺CD73⁺ memory phenotype (Figure 1B, right panel – Sup. Figure 1). This contrasted with PP where 5-10% of IgA⁺ B cells harbored a GL7⁺ germinal center (GC) phenotype (Sup. Figure 1).

The liver also hosted a significant contingent of PC (CD19^{low}CD138⁺), accounting for 0.6-1.0% of LNPC (Figure 1A), 70% of which were expressing IgA, and the remaining comprised almost equal proportions of IgG and IgM PC (Figure 1D-E). These liver IgA PC co-expressed surface and cytoplasmic IgA, and exhibited a classical plasmacytoid morphology (Figure 1F). Importantly, liver IgA⁺CD138⁺ cells were not enriched in apoptotic cells (Sup. Figure 2). Finally, the liver harbored the highest pool of IgA PC after the small intestinal *Lamina Propria* (SI LP) (Figure 1F - histograms). Thus, mouse liver contains a major population of naïve follicular B2 cells, some memory B cells and a significant contingent of IgA-producing cells.

IgA plasma cells are enriched in human liver and localize in portal tracts.

We then characterized B cell subpopulations in normal human liver and used for comparison palatine tonsils, a well-defined site for B cell responses. B cells (CD19⁺CD20⁺) accounted for 1% of CD45⁺ LNPC, while they represented about half of the hematopoietic cells in tonsils (Figure 2A). In contrast to the tonsils, liver PC (CD19⁺CD20⁻) represented two thirds of CD19⁺ cells (i.e. 2.4% of LNPC) (Figure 2A). Further phenotyping confirmed that CD19⁺CD20⁻ cells corresponded to CD24⁻CD27^{hi}CD38^{hi} PB/PC, and revealed that CD19⁺CD20⁺ B cells contained comparable proportions of mature naïve (CD27⁻CD38⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺) and memory B cells (CD27⁺CD38⁻CD24⁺IgD⁻), accounting for 16-18% of total liver B cells (Figure 2B). Liver memory B cells contained equal proportions of surface IgA (sIgA)- and sIgM-expressing cells (roughly 40% each) and some sIgG⁺ cells (Figure 2C). Importantly, while IgG producing cells were over-represented in tonsils (70%), IgA was the dominant isotype expressed by PC in the liver (Figure 2D-E) with about 2 thirds of IgA1 (figure 2D-E). Finally, while CD20⁺ B cell resided both near portal tracts and within the liver parenchyma, IgA

PC mostly concentrated in the connective tissue around portal tracts (Figure 2F). Therefore, human liver contains naïve and memory B cells and a dominant population PB/PC that mainly secrete IgA.

Mouse liver IgA⁺CD138⁺ cells are plasmablasts.

In mice, B cell differentiation into PC is characterized by loss of CD19 and B220 and acquisition of CD138¹³, Ly6C¹⁴, and of the transcription factor Blimp-1¹⁵, whose level increases with PC maturation¹⁶. Liver IgA⁺CD138⁺ cells were CD19^{-/lo}B220^{-/lo} and, despite high expression of CD138, poorly expressed Blimp-1 and Ly6C (Figure 3A – Sup. Figure 3). Their PB phenotype was further indicated by higher expression of MHC-class II and CD80, and homogenous expression of the proliferation marker Ki-67, contrasting with the resting phenotype of terminally differentiated IgA PC in SI LP and BM (Figure 3A). Moreover, an *in vivo* BrdU pulse-chase experiment showed that almost all liver IgA⁺CD138⁺ cells had incorporated BrdU within 6 days, and the staining was rapidly lost after BrdU withdrawal (Figure 3B), indicating that liver IgA PB were recently generated and renew rapidly.

Analysis of intensity of cytoplasmic IgA staining of IgA⁺CD138⁺ cells, IgA spot size and amount of IgA produced *in vitro* revealed that while BM PC appeared by far the best IgA producing cells, hepatic and splenic IgA secreting cells produce more IgA on a per cell basis than their SI LP counterpart (Figure 3C). So, despite their immature phenotype, liver IgA PB exhibit substantial IgA secretion capacities.

Finally, although the majority of liver IgA PB expressed the mucosal integrin $\alpha 4\beta 7$, they differed from SI LP IgA PC by lower expression of CCR9 and lack of CCR10, similarly to splenic IgA secreting cells (Figure 3D).

The liver is an alternative IgA effector site

To decipher whether an IgA response can develop in the liver after mucosal immunization, mice were orally immunized with both the TD Ag cholera toxin (CT) and the TI Ag NP-Ficoll, and IgA responses were assessed in various organs. After the first immunization, CT-specific IgA SFC appeared in the liver in numbers exceeding those in the SI LP, but were hardly detected in BM and spleen (Figure 4A – prime). The frequency of CT-specific IgA SFC dramatically increased after the booster immunization in the SI LP but not in the liver (Figure 4A – boost). Additionally, NP-specific IgA SFC were detected in similar frequencies in liver and SI LP, but not in spleen and BM (Figure 4B). These data indicate that the liver constitutes an IgA effector site following oral immunization with both TD and TI Ags.

To investigate whether the orally-induced IgA producing cells differentiated *in situ* in the liver, or derived from B cells primed elsewhere, we adoptively transferred transgenic NP-specific (QM) B cells¹⁷ into CD45.1 congenic B6 mice, and tracked their proliferation and IgA expression in various organs after oral immunization with NP-Ficoll (Sup. Figure 4). At day 3 after immunization, IgA expressing B cells, corresponding to the more divided cells, were detected only in PP and accounted for up to 10% of QM B cells (Figure 4C), indicating that IgA CSR occurred in PP and not liver. At day 6, IgA^{int} switched B cells were still present in PP and a minor population of highly divided IgA^{hi} B cells appeared in PP, MLN and liver, suggesting that CD19⁺IgA⁺ PB generated in PP can migrate to the liver. Furthermore, at day 6, NP-specific IgA PB (IgA⁺CD19⁺CD138⁺) were found in the SI LP as expected, but also in the liver, but not spleen (Figure 4D). Expression level of CD138, Ly6C and CD19 confirmed that these liver IgA⁺ cells were *bona fide* IgA PB (Figure 4E). Altogether, these data indicated that after oral immunization with a TI Ag, IgA PB primed in PP migrate to both intestinal LP and liver.

Liver IgA PB derive from recently switched PP IgA B cells at steady state

To determine if liver IgA PB also originate from PP at steady state, AID-Cre-EYFP reporter mice¹⁸ were treated with tamoxifen to track recently switched B cells. 24h after tamoxifen treatment, YFP was exclusively expressed in PP IgA B cells (Figure 5A), and gradually increased with time only in PP (Figure 5B). In contrast, YFP⁺IgA⁺ PB were found not only in PP but also in liver - where they accounted for up to 5% of total IgA PB - and to a far lesser extent in SI LP and spleen. Interestingly, the kinetics of appearance of YFP⁺IgA⁺ PB in the liver paralleled that of YFP⁺IgA⁺ B cells in PP (Figure 5B). In addition, repeated injection of FTY720, which interferes with S1P₁ receptor and blocks IgA PB egress from PP¹⁹, did not affect IgA⁺B220⁺ B cells in PP but increased total IgA⁺B220⁺ PB (Figure 5C). Furthermore, amongst YFP⁺IgA⁺ cells, only PB (CD138⁺B220⁺) were increased (Figure 5C-D), confirming that FTY720 induced the retention of IgA PB in PP. Following FTY720 treatment, virtually no YFP⁺IgA PB were detected in the liver, while their SI LP counterpart was barely affected (Figure 5E). These data demonstrate that IgA PB differentiated in PP constantly and rapidly seed the liver at steady state.

IgA produced by liver plasmablasts recognize gut commensal bacteria.

10-30% of fecal bacteria in both mice and humans^{20,21} are coated with IgA, revealing that IgA produced in the SI LP recognize certain commensal bacterial species. To determine whether liver IgA display a similar reactivity, we used FCM to measure IgA binding to commensal bacteria (Sup.

Figure 5). As expected, coating by endogenous IgA was found in around 30% of fecal bacteria isolated from WT, but not *Rag*^{-/-} mice (Figure 6A). Interestingly, IgA from cultured LNPC or intestinal fluid similarly bound to roughly 20% of *Rag*^{-/-} fecal bacteria, while much less could be coated by serum IgA (Figure 6B & 6C). Although the relative avidity of liver-derived IgA for fecal bacteria, as determined by the MFI, was slightly lower as compared to gut-derived IgA, it was much higher than that of serum IgA (Figure 6C). These data support that at least a fraction of IgA produced in the liver is directed against commensal flora components.

Increase in hepatic IgA plasmablasts in alcohol-induced hepatitis parallels elevation of serum IgA and IgA liver deposits.

We finally used a model that mimics acute-on-chronic alcoholic liver disease (ALD) in human²² to investigate whether liver injury affects liver IgA PB. Chronic-binge ethanol feeding resulted in significant body weight loss (Figure 7A), elevation of hepatic transaminases and development of micro-steatosis (Figure 7B). Alcohol consumption induced a dramatic reduction of intestinal IgA PC, while liver IgA PB were increased by roughly two folds (Figure 7C-D). IgA secreting cells were not significantly altered in PP, spleen and BM (Figure 7D). As described in human ALD^{23,24}, ethanol feeding resulted in elevation of serum IgA (Figure 7E) and IgA deposits in liver sinusoids (Figure 7F). Treatment of mice with FTY720 during the 10 days of pair-feeding resulted in a selective rise of IgA⁺B220^{low}CD138⁺ PB in PP, associated with a nearly complete disappearance of these cells from the liver (Figure 7C-D), without affecting their frequency at other sites. Importantly, FTY720 treatment prevented both the rise of serum IgA (Figure 7E) and sinusoidal IgA deposits (Figure 7F), and ameliorated the clinical (Figure 7A), macroscopic and biological (Figure 7B) signs of the disease. Thus, ethanol-induced liver injury was associated with a selective increase of hepatic IgA PB, likely accounting for increased circulating IgA levels and IgA deposits in liver sinusoids.

Discussion

The concept of a gut-liver axis, which refers to the complex functional interplay between the 2 organs, was initially introduced following the description in liver cirrhotic patients of increased serum IgA directed against intestinal bacteria and food antigens²⁵, and further supported by numerous observations in both mouse models and patients²⁶. This functional link is largely based on the fact that important quantities of intestinal Ags permanently reach the liver via the portal vein. Our study adds a new mechanistic piece in this axis by showing that a fraction of the IgA PB generated in the GALT against intestinal Ag and commensals home to the liver, which thus appears as an alternative IgA effector site.

We show that mouse liver contains at steady state an important pool of naive follicular B cells and sparse switched memory B cells, but also features a major enrichment in IgA-producing cells as compared to most lymphoid organs, including BM. Thorough characterization of mouse liver IgA-producing cells revealed a PB phenotype, characterized by a highly proliferative state, high levels of MHC-II and CD80, and intermediate levels of the master PC transcription factor Blimp-1. Yet, these cells displayed a significant IgA secretion capacity, comparable or even higher to that of IgA PC from the SI LP. Importantly, we identified that besides the intestinal mucosa, the liver constitutes an effector site for Ag-specific IgA responses following oral immunization with either TD or TI Ags, a finding in line with old studies proposing that the liver could constitute a site for antibody production⁸, especially IgA^{27,28}. Importantly, this likely also holds true in humans, as in normal human livers PC represented about half of the total B cell infiltrate and were dominated by IgA1 and IgA2 producing cells. Co-existence of naive B cells and IgA PB in the mouse liver raised the issue as to whether the liver constituted a potential site of B cell activation. That IgA CSR might occur in the liver is highly unlikely given that neither recently switched sIgA expressing B cells nor AID transcripts (*data not shown*) were detectable at this site. Moreover, transgenic mouse models allowing for tracking of i) Ag-specific B cells after oral immunization and ii) recently switched B cells at steady state, revealed that IgA CSR exclusively takes place in PP and not liver. More importantly, kinetics analysis and blocking PB egress from PP revealed that, similarly to their intestinal counterpart, liver IgA-producing cells originate from PP both at steady state and after oral immunization. After transit in mLN, IgA PB originating from PP thus follow two distinct pathways to either seed the gut LP or the liver, but whether this differential migration relies on a stochastic process or on the existence of gut- and liver-tropic PB subsets is questionable. While expression of the integrin $\alpha 4\beta 7$ and the chemokine receptors CCR9 and CCR10 dictate intestinal homing of IgA PB²⁹, CXCR4 promotes homing and survival of PC to BM³⁰. Liver IgA PB lack CXCR6, involved in NKT cell homing to the liver³¹, express low level of CXCR4 and can be distinguished from their intestinal

counterparts, by lower expression of CCR9, lack of CCR10, but expression of $\alpha 4\beta 7$. Because $\alpha 4\beta 7$ interaction with MadCAM-1 promotes T cell recruitment to portal tracts³², this integrin may also condition IgA PB migration to the liver. Moreover, the bimodal expression of CCR9 and CCR10 on mLN IgA PB (*data not shown*) suggests that cells expressing low levels of these gut-tropic chemokine receptors might preferentially home to the liver.

An important issue concerns the putative role of an *in situ* IgA response in the liver. We observed that specific IgA-producing cells first appeared in the liver before the intestinal LP upon oral immunization with the TD Ag CT. This suggests that IgA released in the liver microenvironment or the duodenum via the bile may provide a first line of protection against infectious agents penetrating in the digestive tract. In addition, IgA produced by liver PB poised near the portal tracts have, similarly to intestinal IgA, a strong reactivity with commensal bacteria, suggesting that hepatic IgA-producing cells may control liver homeostasis facing continuous encounter with microbiota-derived antigens entering the portal circulation. Indeed, LPS capture by liver IgA could reduce its direct pro-inflammatory effects on hepatocytes and other TLR4-expressing liver cells, and also favor its detoxification by Kupffer cells via binding to Fc α R1, as demonstrated for circulating IgA¹⁰. As liver IgA appear to be more reactive to commensal components than serum IgA, we propose that hepatic IgA may have a prime role in endotoxin clearance from the portal circulation. These functions may be favored by direct sensing of bacterial Ags, since we found that mouse and human liver IgA PB express a surface BCR, which is presumably functional as documented for BM IgA PC³³, and may enhance their survival and Ig production. Besides interacting with target Ag, liver IgA could also contribute to immune tolerance by conditioning local DC to exert tolerogenic functions after engaging DC-SIGN, as recently described for BM-DC *in vitro*³⁴.

Alcoholic liver disease (ALD) is characterized by an abnormal penetration of intestinal bacterial products in portal circulation^{11,35}, which significantly contributes to hepatic inflammation and fibrosis^{36,37}, and is associated with increased serum IgA and IgA deposits in liver sinusoids¹². We observed similar IgA disorders in a mouse model of ALD induced by chronic plus binge ethanol feeding. Interestingly, this was correlated with a selective increase of liver IgA producing cells. Blocking IgA PB egress from PP using FTY720 led to complete disappearance of IgA PB from the liver and prevented the rise in serum IgA and liver IgA deposits, resulting in major improvement of liver injury as assessed by steatosis and serum transaminases. This adds to the previously documented beneficial action of FTY720 on non-alcoholic hepatitis^{38,39}. These observations indicate that the enhanced IgA production in the liver following alcohol consumption is most likely responsible for the observed IgA disorders. Whether such pathological increase of liver IgA-producing cells plays a role in liver injury or merely results from an inoperative endotoxin clearance

mechanism remains to be determined. In any case, our study suggests that FTY720 could exert beneficial effects on ALD and prevent complications, such as secondary IgA nephropathy, by blocking IgA PB trafficking from GALT to the liver.

Methods

Mice

Balb/c and C57BL/6-Ly5.1 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Quasi-Monoclonal (QM) mice¹⁷ were kindly provided by M. Cascalho (Ann Arbor, MI, USA). AID-Cre-ERT2 Tg mice¹⁸ were obtained from C.A. Reynaud (Paris, France) and were crossed with ROSA26-loxP-EYFP mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Their progeny received 10mg tamoxifen (Sigma Aldrich, St Louis, MO) orally on two consecutive days. Blimp-1-GFP mice¹⁶ were kindly provided by S. Nutt (Victoria, Australia). In some experiments, mice received daily i.p. injections of 25µg FTY720 (Sigma Aldrich). Except Balb/c mice, all mice were bred under specific pathogen-free conditions in the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) (Ecole Normale Supérieure, Lyon, France) and were used at 10-16 weeks of age. All mouse studies were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15) in accordance with the European guidelines for animal experiments. Except when indicated, Balb/c mice were used.

Human liver samples

Macroscopically and histologically healthy portions of human liver were obtained from patients with colorectal carcinoma undergoing liver metastasis resection at Centre Léon Bérard and Centre Hospitalier Lyon-Sud (Lyon, France). All patients gave informed consent and protocols were approved by the hospital ethics committee.

Liver non-parenchymal cells preparation

Mouse LNPC were obtained by mechanical dissociation using GentleMACS (Miltenyi Biotec, Paris, France) of perfused liver, followed by 40/80% Percoll density gradient centrifugation (GE Healthcare, Aulnay-Sous-Bois, France). Human LNPC were obtained from perfused liver fragments by 30-40 min enzymatic digestion with 0,1mg/ml DNase I and 1mg/ml collagenase IV (Worthington, Lakewood, NJ), followed by a Percoll gradient.

Oral immunization and Ag specific B cells in vivo tracking

Mice were orally immunized by gavage with 5mg NP₇₇-AECM-FICOLL (NP-Ficoll) (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) and/or 10µg cholera toxin (CT) (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) in NaHCO₃ 0.2M, pH8.3. For adoptive transfer experiments, spleen cells from

QM mice (Ly5.2) were stained with CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA) and injected i.v. (10^7) into C57BL/6-Ly5.1 recipients just prior to oral immunization.

Mouse model of chronic alcohol consumption

We used the recently described "chronic-binge ethanol feeding model"²². Briefly, after 5 days acclimatization to feeding tubes and Lieber-DeCarli liquid diet (Bio-Serv, FrenchTown, NJ, USA), mice were pair-fed for 10 days with either control diet or 5% ethanol containing liquid diet. At day 10, mice received a single binge of ethanol (5g/kg) or isocaloric dextrin-maltose and were sacrificed 9h later. Serum AST and ALT were measured with an ABBOTT Architect c16000 chemistry analyzer.

Analysis of IgA coating of fecal bacteria by flow cytometry

Fecal bacteria were isolated as described elsewhere²¹ and were incubated for 1hr on ice with sera, intestinal washes or LNPC culture SN diluted in PBS+protease inhibitor to reach a concentration of 1µg/ml of IgA. After washings, bacteria were incubated with anti-IgA-biotin (Southern Biotech, Birmingham, AL) followed by streptavidin-APC (BD Pharmingen, Pont de Claix, France), fixed in 4% PFA, washed, and suspended in PBS with 2.5µg/ml DAPI (Sigma Aldrich). 30000 events were analyzed with the BD LSRII cytometer at a flow rate of 500-1500 evts/sec. DAPI positive events were considered as bacteria.

Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. Unpaired *t* test was used for experimental groups containing $n \geq 10$ points, whereas Mann-Whitney non-parametric test was preferred for experimental groups containing $4 \leq n < 10$ points. Histograms data are shown as mean \pm SEM and results were considered statistically significant when *P* value < 0.05 (ns: $p > 0.05$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

References

1. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:147–163.
2. Knolle PA, Germann T, Treichel U, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999;162:1401–1407.
3. Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, et al. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 2009;50:612–621.
4. Goubier A, Dubois B, Gheit H, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008;29:464–475.
5. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;12:821–832.
6. Brandtzaeg P, Johansen F-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005;206:32–63.
7. Brown WR, Kloppel TM. The role of the liver in translocation of IgA into the gastrointestinal tract. *Immunol Invest* 1989;18:269–285.
8. Manning RJ, Walker PG, Carter L, et al. Studies on the origins of biliary immunoglobulins in rats. *Gastroenterology* 1984;87:173–179.
9. Nagura H, Tsutsumi Y, Hasegawa H, et al. IgA plasma cells in biliary mucosa: a likely source of locally synthesized IgA in human hepatic bile. *Clin Exp Immunol* 1983;54:671–680.
10. van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, et al. FcαRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 2000;6:680–685.
11. Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742–747.
12. van de WIEL A, Schuurman HJ, Kater L. Alcoholic liver disease: an IgA-associated disorder. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1025–1030.
13. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;5:230–242.
14. Wrammert J, Källberg E, Agace WW, et al. Ly6C expression differentiates plasma cells from other B cell subsets in mice. *Eur J Immunol* 2002;32:97–103.
15. Soro PG, Morales-A P, Martínez-M JA, et al. Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells. *J Immunol* 1999;163:611–617.
16. Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* 2004;200:967–977.
17. Cascalho M, Ma A, Lee S, et al. A quasi-monoclonal mouse. *Science* 1996;272:1649–1652.
18. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009;10:1292–1299.
19. Gohda M, Kunisawa J, Miura F, et al. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J Immunol* 2008;180:5335–5343.
20. van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, et al. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 1996;38:348–354.
21. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 2014;41:152–165.
22. Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627–637.

23. van de WIEL A, Delacroix DL, van Hattum J, et al. Characteristics of serum IgA and liver IgA deposits in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1987;7:95–99.
24. van de WIEL A, van Hattum J, Schuurman HJ, et al. Immunoglobulin A in the diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1988;94:457–462.
25. Volta U, Bonazzi C, Bianchi FB, et al. IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis. *Ric Clin Lab* 1987;17:235–242.
26. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2015;148:30–36.
27. Altorfer J, Hardesty SJ, Scott JH, et al. Specific antibody synthesis and biliary secretion by the rat liver after intestinal immunization with cholera toxin. *Gastroenterology* 1987;93:539–549.
28. Wu H-YERM. Antibody-secreting cell responses in the mouse liver. *Immunology* 1992;443–448.
29. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, et al. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* 2008;1:11–22.
30. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 2013;251:177–188.
31. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 2005;3:e113.
32. Adams DH, Eksteen B, Curbishley SM. Immunology of the gut and liver: a love/hate relationship. *Gut* 2008;57:838–848.
33. Pinto D, Montani E, Bolli M, et al. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 2013;121:4110–4114.
34. Diana J, Moura IC, Vaugier C, et al. Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *The Journal of Immunology* 2013;191:2335–2343.
35. Cariello R, Federico A, Sapone A, et al. Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: Its relationship with the aetiology and the entity of liver damage. *Dig Liver Dis* 2010;42:200–204.
36. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res.* 2002;8:319–327.
37. Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science Translational Medicine* 2014;6:237ra66–237ra66.
38. Yin X-D, Jia P-J, Pang Y, et al. Protective effect of FTY720 on several markers of liver injury induced by concanavalin a in mice. *Curr Ther Res Clin Exp* 2012;73:140–149.
39. Kong Y, Wang H, Wang S, et al. FTY720, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, improves liver fibrosis in a mouse model by impairing the motility of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Inflammation* 2014;37:1326–1336.

Aknowledgements

We thank Sébastien This, Amélien Sanlaville, Julien Gaillard, Claire Macari, Rémy Robinot and Marion Chevandier for expert technical assistance, Laurent Genestier and Olivier Thaumat for helpful discussions and advices. We are grateful to Pr Michel Rivoire (Centre Régional Léon Bérard, LYON, FR) and Pr Olivier Glehen (Centre Hospitalier Lyon-Sud, PIERRE-BENITE, FR) for provision of human liver samples. We also warmly thank Thibault Andrieu and Sebastien Dussurgey (Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444) for their technical expertise and cell sorting, and Marie Teixeira, David Gallouche and the staff of the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) of Ecole Normale Supérieure de Lyon for maintaining and breeding mouse strains.

Supplemental methods

Cell preparation

Single cell suspensions from spleen, mLN and PP were obtained by mechanical dissociation in RPMI medium (GIBCO, Life Technologies) containing 2% FCS (HyClone, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and 0,1mg/ml DNase I (Roche). Bone marrow cells were obtained by flushing tibia and femur with the same medium. Leucocytes from the gut *Lamina Propria* (LPL) were obtained as described elsewhere¹, with some modifications. Briefly, small intestines cleared of fat connective tissue and Peyer's patches were rinsed in PBS containing 1mM DTT (DL-Dithiothreitol – Sigma) to remove mucus, and cut into 0.3-0.5cm pieces. Intestinal pieces were incubated twice for 20min at 37°C in PBS containing 5% FCS, 5mM EDTA (inVitrogen, Life Technologies) and 1mM DTT to remove epithelial cells. They were then digested for 60min at 37°C with 12.5µg/ml Liberase (Roche) and 0,1mg/ml DNase I in RPMI. LPL were finally purified on a 40-80% Percoll (GE Healthcare) density gradient.

Flow cytometry

Mouse cells were first incubated with FcR-blocking antibody (2.4.G2) for 15min at 4°C. Cells were then stained with various combinations of the following antibodies: anti-mouse IgA-FITC from Southern Biotech (Birmingham, AL, USA), CD19 (1D3) either conjugated to PerCP-Cy5.5, PE or APC-H7, CD45R/B220 (RA3-6B2) conjugated to PE or BV786, CD138 (281-2) conjugated to APC or BV605, CD45 (30-F11) conjugated to APC-Cy7 or PE-Cy7, CD45.1-PE (A20), CD45.2-APC (104), Ly6C-PE-Cy7 (AL-21), CD21-APC (7G6), IA/IE-PE (M5/114.15.2), CD80-APC (16/10A1), CD184-APC (2B11-CXCR4), Ki67-AlexaFluor647 (B56), IgM-PerCP-Cy5.5 (R6-60.2) and IgG1-V450 (A85-1) from Becton Dickinson (Pont de Claix, France), CD11b-APC-eFluor780 (M1/70), CD23-PE-Cy7 (B3B4), IgD-PE (11-26), CCR9-PE (CW-1.2), α 4- β 7-PE (DATK32) from eBioscience (SanDiego, CA, USA), CCR10-PE (248918) and CXCR6-PE (221002) from R&D systems (Lille, France) ; anti-human IgA-FITC, IgA1-FITC(B3506B4) and IgA2-RPE(A9604D2) from Southern Biotech, IgD-PerCP-Cy5.5 (IA6-2), IgM-BV421 (NHM-88), CD24-BV605 (ML5) and CD27-BV711 (O323) from BioLegend (SanDiego, CA, USA), IgG-PE (G18-145), CD19 (HIB19) either conjugated to PE or PE-CF594, CD20-APC (L27), CD38-PE-Cy7 (HIT2) and CD45-AlexaFluor700 (HI30) from BD. eFluor780 and eFluor605 Fixable Viability Dyes (eBioscience) were used to discriminate dead cells and Cytofix/Cytoperm kit (BD) was used to fix and permeabilize cells for intracytoplasmic staining. The BD Transcription factor buffer kit was used to detect intranuclear antigens. BrdU uptake was measured using the BD BrdU flow kit in accordance to the manufacturer recommendations. FACS analyses were performed using MACSQuant VRB (Miltenyi

Biotec), LSR II and LSR Fortessa cytometers (BD) equipped with the Diva software and data were analyzed with the FlowJo 9 software (TreeStar Inc.).

Detection of secreted immunoglobulins and spot-forming cells (SFC)

For total mouse IgA detection, NUNC Maxisorp ELISA 96-well plates (Thermo Scientific) were coated with anti-mouse Ig overnight. After incubation with serial dilutions of samples, IgA was revealed with anti-mouse IgA-HRP and TMB substrate (KPL, Gaithersburg, USA). Total mouse IgA, IgG and IgM producing cells was determined using ELISpot by coating MultiScreen IP 96-well plates (Millipore) with anti-mouse Ig overnight, followed by overnight cell culture and revelation with anti-mouse IgA, IgG and IgM-AP and BCIP/NBT substrate (Sigma-Aldrich). For detection of NP- and CT-specific IgA SFC, ELISpot plates were coated with 5µg/ml NP₆-BSA (Biosearch Technologies) or with 2µg/ml of G_{M1}-Ganglioside (Sigma-Aldrich) followed by 0,5µg/ml of CT (List Biological) and revealed as described above. We used FLUOROSpot to detect human IgA, IgA1, IgA2, IgG and IgM producing cells. After coating of ELISpot plates with anti-human Ig, cells were incubated overnight, and detection was achieved by adding the following fluorochrom-conjugated antibodies: IgA-FITC, IgA1-FITC, IgA2-PE, IgG-PE and IgM-FITC. Spots were counted with ImmunoSpot Analyser S6 Ultra-V (CTL-Europe GmbH, Bonn, Germany). All purified and coupled antibodies were purchased from Southern Biotech, except anti-human IgG-PE and anti-human IgM-FITC from BD.

Liver histology and immunochemistry

Mouse livers were fixed overnight in 10% neutral buffered formalin (Sigma Aldrich), dehydrated for 6 hours in 30% sucrose solution and finally flash freezeed on dry ice in isopentane. 8µm cryosections were realized. Liver steatosis was detected using the Oil Red O staining procedure as previously described², and immunohistochemistry was performed according to standard protocols. Briefly, sections were rehydrated in PBS, saturated with 20% goat serum and endogenous avidine-biotine were blocked (Avidine/Biotin blocking kit, VECTOR). They were then sequentially incubated with biotinylated goat anti-mouse IgA (Southern Biotech) and texas red-coupled streptavidine (CALTAG). Nuclei were stained with DAPI (1µg/ml in PBS), and sections were mounted in Fluoromount G (eBioscience). Human paraffin-embedded liver sections were deparaffined in citrate water bath and stained for IgA, Igk and CD20 as described above. Fluorescence and brightfield pictures were taken with an Axiolmager Z1 microscope (Zeiss) using the Metamorph software.

Fluids preparation for analysis of IgA-coating on fecal bacteria

LNPC were cultured for 36 hrs in RPMI containing 10% FCS, 1% HEPES and 1% penicillin-streptomycin at a concentration of 3.10^6 cells/ml, and culture supernatant (SN) was harvested and concentrated on 50kDa Amicon Ultra-15 Centrifugal filter tubes (Millipore). Intestinal fluids were obtained by washing for 3-5 min the intestinal lumen with 2ml of PBS containing cOmplete protease inhibitor (Roche).

Supplemental references

1. Lefrançois L, Lycke N. *Isolation of Mouse Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes, Peyer's Patch, and Lamina Propria Cells*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001:3.19.1–3.19.16.
2. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* 2013;8:1149–1154.

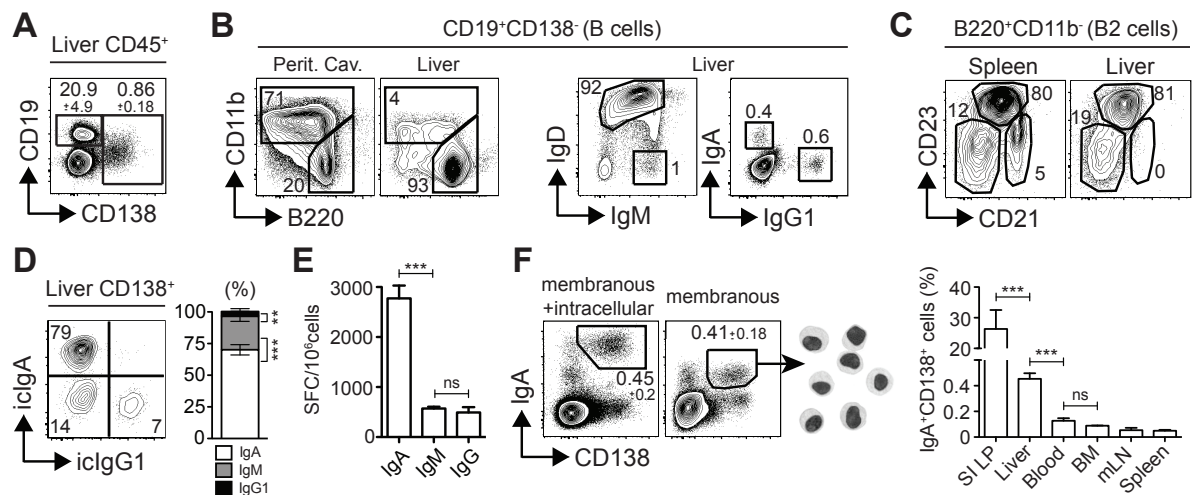


Figure 1.

Mouse liver contains a significant population of naïve B cells and IgA secreting cells.

(A) Identification of B cells (CD19⁺CD138⁻) and PC (CD138⁺CD19^{low}) by FCM among CD45⁺ LNPC (n=15, mean±SD). (B) Identification of B1 (CD11b⁺B220⁺) and B2 (CD11b⁻B220⁺) cells in B cells from the peritoneal cavity and liver (*left panel*); frequency of naïve (IgM⁺IgD⁺) and isotype-switched cells in liver B cells (*right panel*). (C) Identification of follicular (CD21⁺CD23^{int}) and marginal zone (CD21^{low}CD23⁺) B cells in liver and spleen. (D) Frequency of icIgA⁺, IgG1⁺ and IgM⁺ cells among CD138⁺CD19^{low} liver cells. (E) Frequency of IgA, IgG and IgM producing cells in LNPC determined by ELISPOT (n=6). (F) Expression of icIgA and mIgA on CD138⁺ LNPC by FCM (left dot-plots) and May-Grünwald Giemsa staining (*right*) of FACS-sorted liver mIgA⁺CD138⁺ cells. (G) Frequency of IgA⁺CD138⁺ cells in CD45⁺ cells from various organs (n=6).

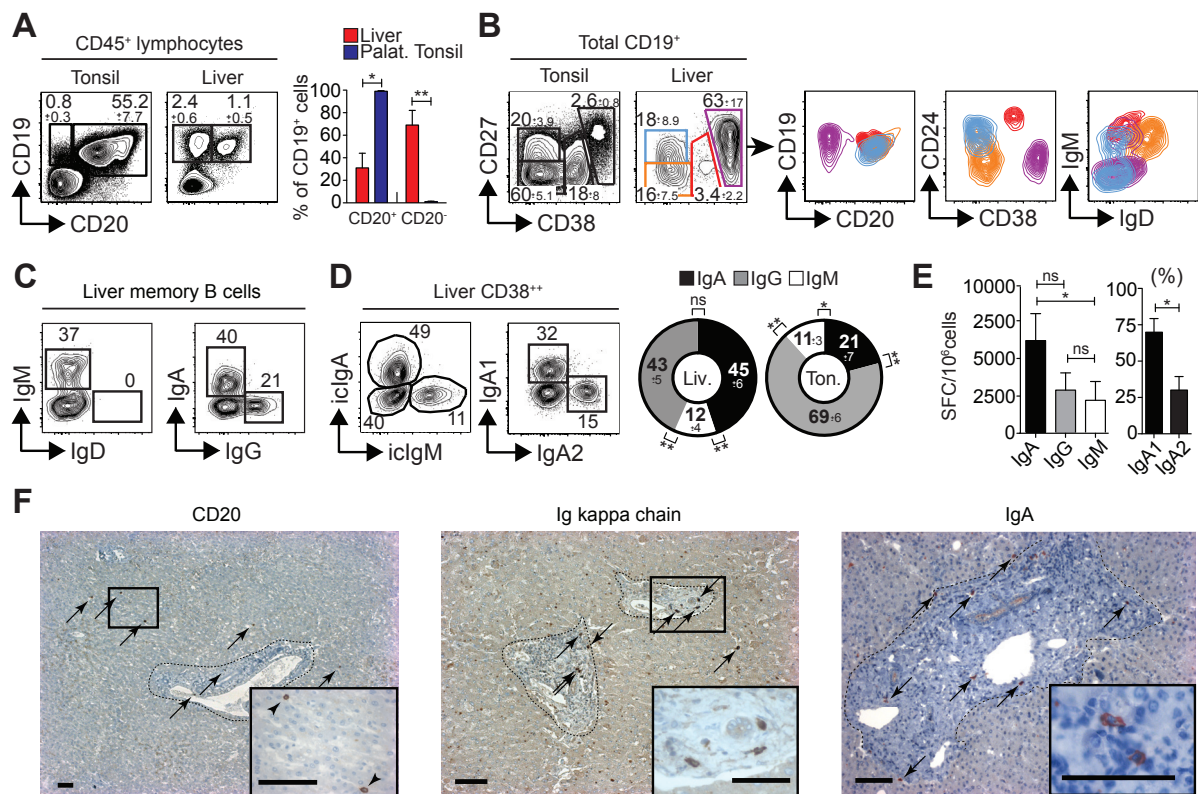


Figure 2.

IgA plasma cells are enriched in human liver and localize in portal tracts.

(A) FCM identification of B cells (CD19⁺CD20⁺) and PC (CD19⁺CD20⁻) among viable CD45⁺ cells (left dot-plots, mean±SD) and frequency of each cell type in human liver (n=10) and tonsil (n=3) (right histograms). (B) Frequency of naïve (CD27⁺CD38⁺, orange), memory (CD27^{int}CD38⁺, blue), transitional/GC (CD27⁺CD38⁺, red) B cells and PB/PC (CD27⁺CD38⁺⁺, purple) in liver and tonsil leukocytes, and extensive phenotype of liver B cell subsets (right multicolor dot-plots, mean±SD). (C) Surface expression of IgD, IgM, IgG and IgA on gated liver CD19⁺CD20⁺CD27⁺ memory B cells. (D) Illustrative FCM dot-plot (left) and pie charts (right) showing the frequency of cells expressing icIgM, icIgG or icIgA among CD19⁺CD20⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺ cells in liver (n=10) and tonsil (n=3). (E) FLUOROSpot analysis of the frequency of IgG, IgA and IgM producing cells in total LNPC (left, n=10) and proportion of IgA1 versus IgA2 in IgA SFC (right, n=10). (F) FCM analysis of icIgA1⁺ and icIgA2⁺ cells among liver CD38⁺⁺ cells. (G) CD20, Ig kappa chain and IgA staining of paraffin-embedded tissue sections of human liver. Arrows indicate positive cells, dotted lines delineates portal tracts from parenchyma (scale bars=100µm).

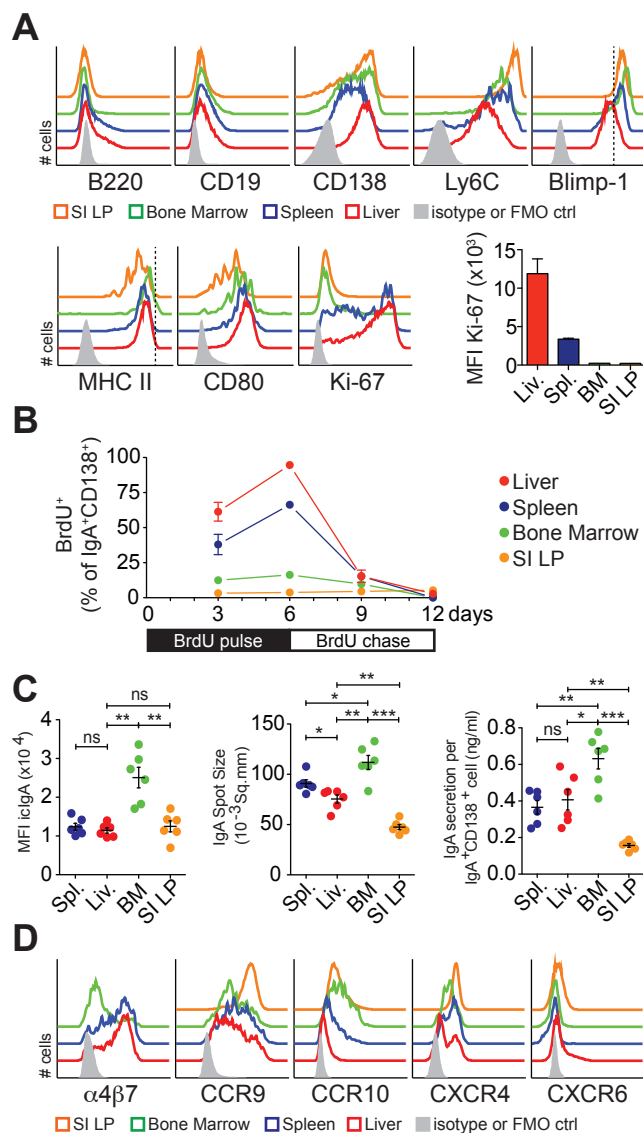


Figure 3.

Mouse liver IgA⁺CD138⁺ cells exhibit a plasmablast phenotype.

(A, B) Expression of B220, CD19, CD138, Ly6C, Blimp-1, MHC-II, CD80 and Ki67 on IgA PC (gated as depicted in Sup. Figure 3) from indicated organs. Grey histograms represent staining with *isotype control Ab* and dotted lines represent the limit between low and high Blimp-1-GFP expression (A) or mean MFI of MCH-II on spleen B cells (B). Right histograms represent the mean MFI of Ki-67 on IgA⁺CD138⁺ PC from various organs (n=4). (C) Kinetics of BrdU incorporation (n=4) in IgA⁺CD138⁺ cells *in vivo*. (D) Comparison of the IgA secretion capacity of IgA PC from various organs as measured by the MFI of icIgA in PC by FCM, the IgA spot size by ELISpot and IgA secretion per IgA PC by ELISA. Each point corresponds to an individual mouse and horizontal bars represent the mean. (E) FCM analysis of homing molecules on IgA PC. Data are representative of two (C-E) or more (A, B) experiments.

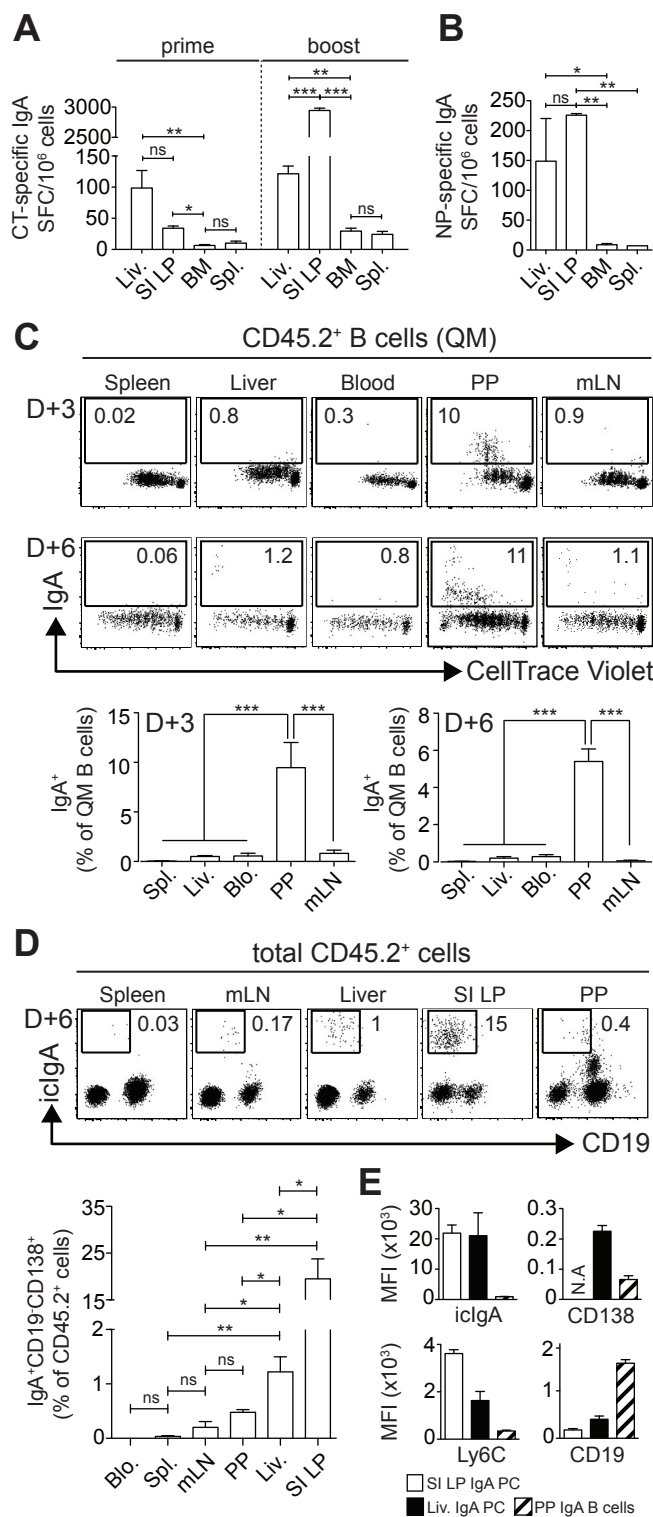


Figure 4.

Liver IgA plasmablasts induced by oral immunization originate from B cells that have undergone IgA CSR in PP.

(A-B) Mice were orally immunized once with NP-Ficoll or twice 14 days apart with CT. Frequencies of CT-specific (A) and NP-specific IgA SFC were determined by ELISpot in the liver (Liv.), SI LP, BM and spleen (Spl.) one week after each immunization (n=5). (C-E) C57BL/6xLy5.1 mice were adoptively transferred with spleen QM cells stained with CTV, and immunized orally with NP-Ficoll and CT. (C) FCM analysis of CTV dilution and surface IgA expression in donor QM B cells (CD45.2⁺CD45.1⁻CD19⁺) in various organs 3 (upper panel) and 6 (lower panel) days after oral immunization. Bottom histograms depict the mean frequency of slgA⁺ cells in NP-specific B cells (n=5). (D) Identification (top representative dot-plots) and frequencies (n=5, bottom histograms) of Ag-specific IgA producing cells (iclgA^{hi}CD19⁻) among donor cells (CD45.1⁻CD45.2⁺) in various organs 6 days after oral immunization. (E) MFI of iclgA, CD138, Ly6C and CD19 staining on iclgA^{hi}CD19⁻ cells from liver, SI LP and iclgA^{int}CD19⁺ from PP. Data are representative of one out of three experiments.

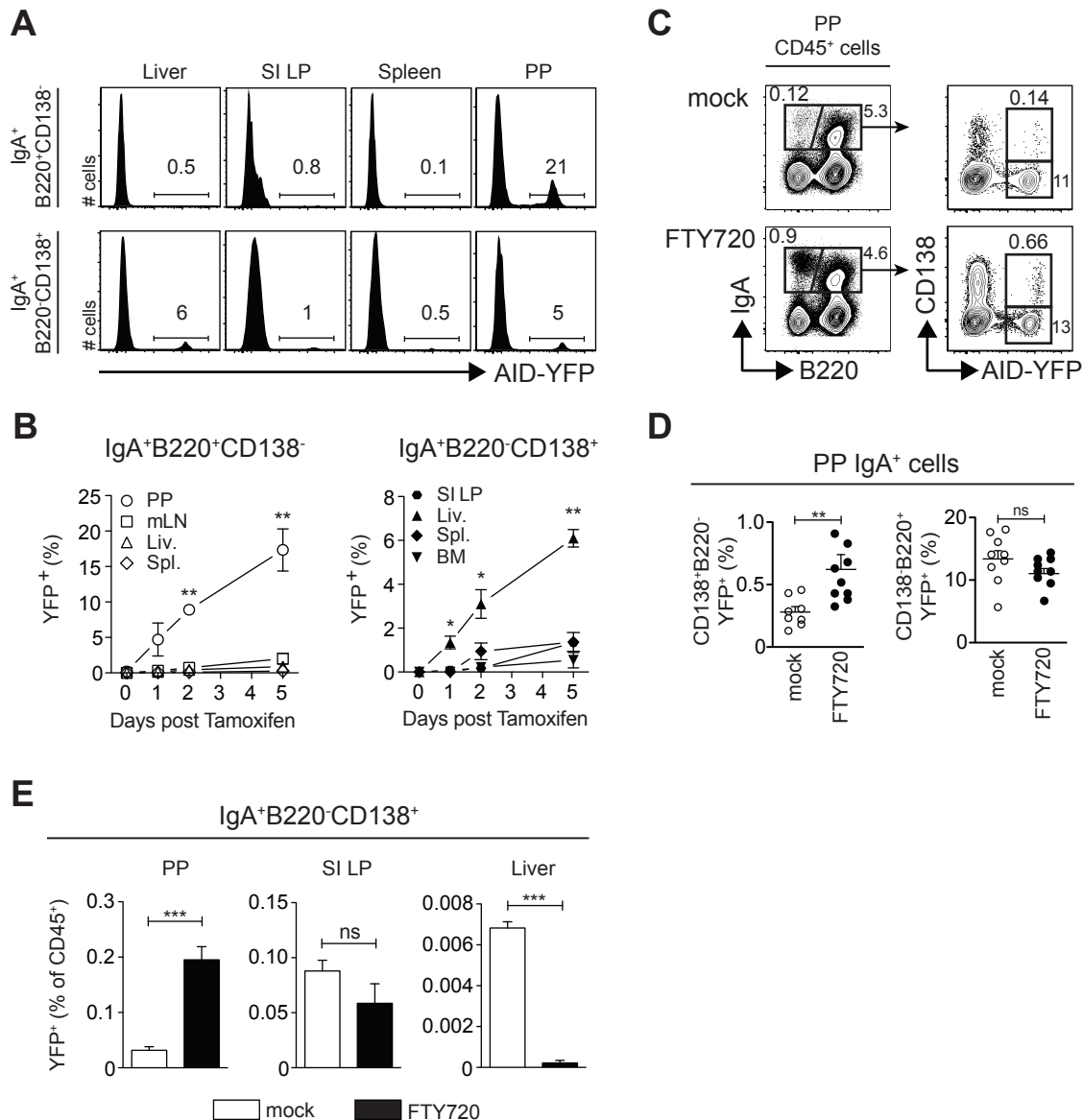


Figure 5.

Liver IgA plasmablasts at steady state originate from recently switched PP B cells.

(A) Representative histograms of AID-YFP⁺ cells in gated IgA⁺ B cells (IgA⁺B220⁺CD138⁻, *upper panel*) and IgA secreting cells (IgA⁺B220⁻CD138⁺, *lower panel*) in various organs at day 5 after tamoxifen treatment. (B) Kinetics analysis of YFP⁺ cells in IgA⁺B220⁺CD138⁻ (*left graph*) and IgA⁺B220⁻CD138⁺ (*right graph*) cells (n=6 per group). Day 0 corresponds to controls without tamoxifen treatment. (C, D) FTY720 was administered i.p. daily starting 1 day before tamoxifen treatment and YFP expression was analyzed at day 5. (C) Representative dot-plots depicting expression of YFP in PP IgA⁺B220⁺ cells according to that of CD138, allowing distinction of AID⁺CD138⁻ B cells from AID⁺CD138⁺ PB cells. (D) Frequency of YFP⁺IgA⁺ B cells (IgA⁺B220⁺CD138⁻) and YFP⁺IgA⁺ PB (IgA⁺B220⁻CD138⁺) among PP CD45⁺ cells in tamoxifen-treated (*open symbols*) versus tamoxifen+FTY720-treated (*black symbols*) mice. Each symbol represents a pool of 2-3 PP from the same mouse and horizontal bars correspond to the mean (n=4). (E) Mean frequency (n=4) of eYFP⁺IgA⁺B220⁻CD138⁺Ly6C⁺ cells among total leukocytes in PP, SI LP and liver of mice treated with tamoxifen alone (*white bars*) or together with FTY720 (*black bars*). Data are representative of two independent experiments.

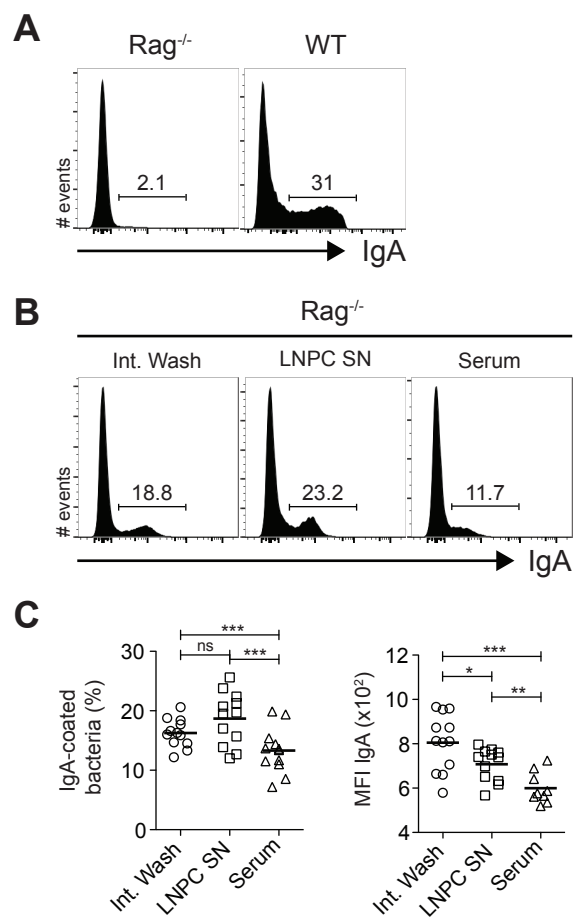


Figure 6.

IgA produced by liver plasmablasts reacts with commensal bacteria.

(A) FCM detection of IgA on fecal bacteria from WT C57BL/6 mice and Rag^{-/-} mice. (B) Representative histograms of IgA staining of fecal bacteria from Rag^{-/-} mice after incubation with intestinal fluid, serum or liver LNPC culture SN. (C) Proportion and MFI of IgA-coating of fecal bacteria from Rag^{-/-} mice. Each symbol represents an individual mouse and horizontal bars correspond to the mean (pool of 4 experiments with 3 mice in each).

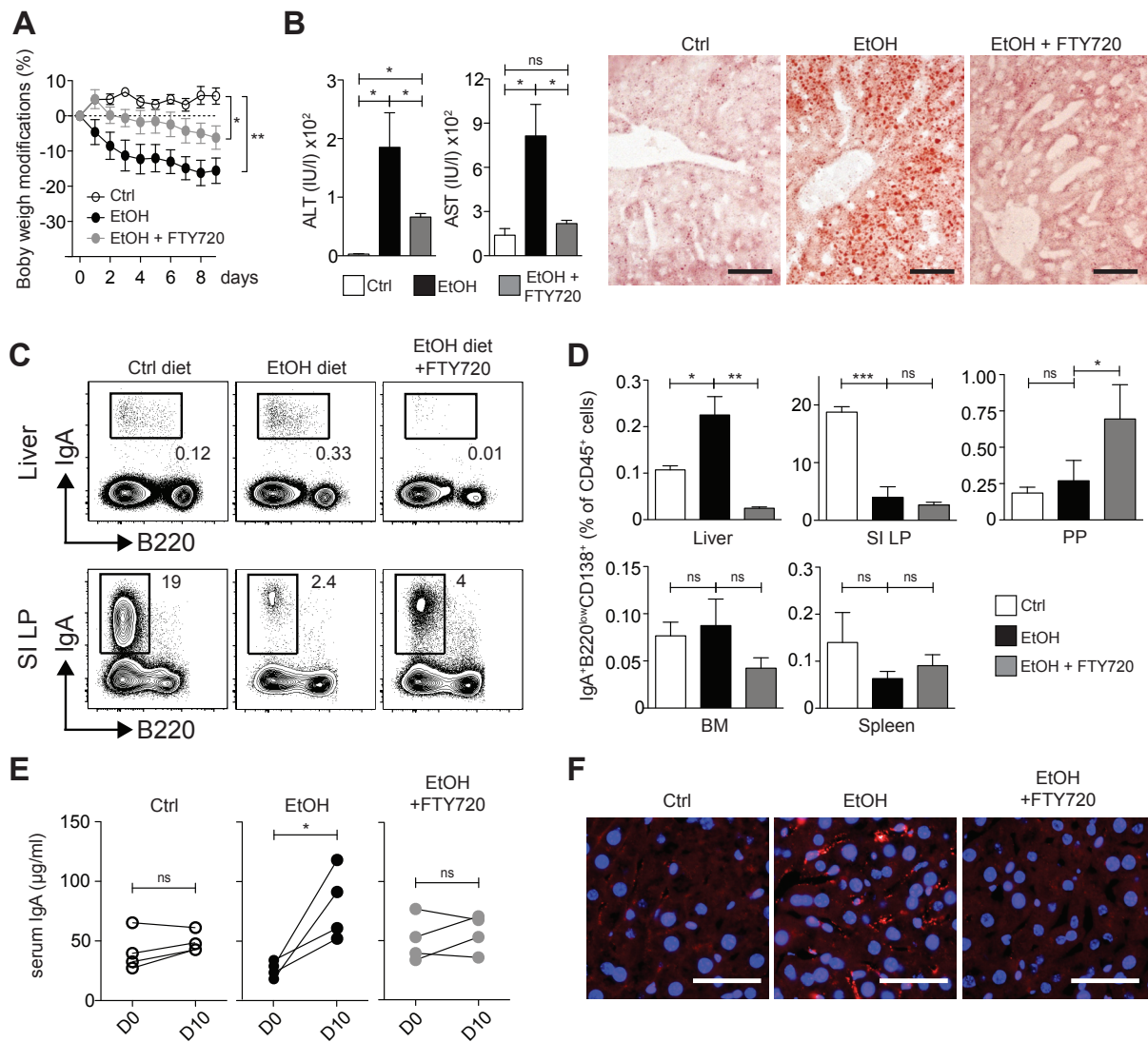
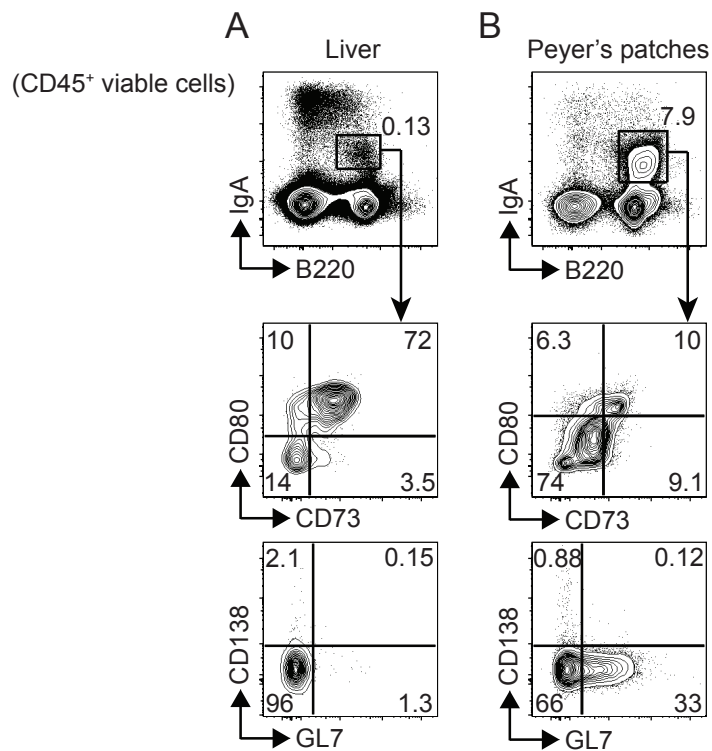


Figure 7.

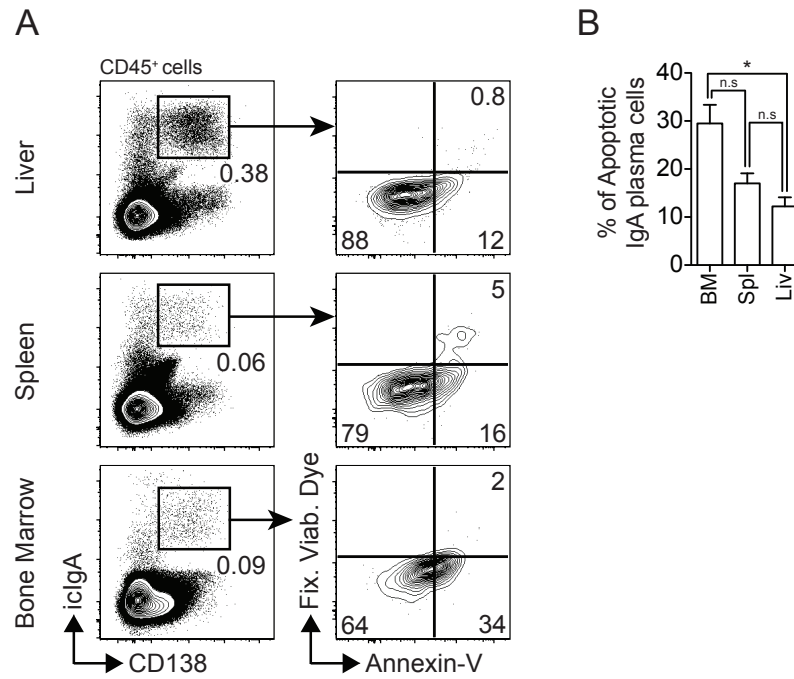
Alcohol-induced hepatitis is associated with elevation of serum IgA, increased hepatic IgA plasmablasts and IgA deposits in liver sinusoids and is prevented by FTY720 treatment.

Mice were pair-fed for 10 days with control or 5% ethanol liquid diet. A group of ethanol-treated mice also received FTY720 daily during pair-feeding. On day 10, mice received a single binge of ethanol or isocaloric dextrin-maltose and were sacrificed 9 hrs later. **(A)** Body weight change at various times post ethanol feeding; **(B)** serum ALT and AST 9hr after the ethanol binge; **(C)** Steatosis (ORO staining of liver section, scale bar: 50µm). **(D)** Representative FCM dot-plots of icIgA⁺B220^{low} cells among CD45⁺ cells in liver and SI LP and **(E)** mean frequency of IgA⁺B220^{low}CD138⁺ cells in various organs (n=4). **(F)** Serum IgA on day 0 and 10. **(F)** IgA (red) and DAPI (blue) staining of liver frozen sections (scale bar: 50µm). Data are representative of 2 independent experiments.



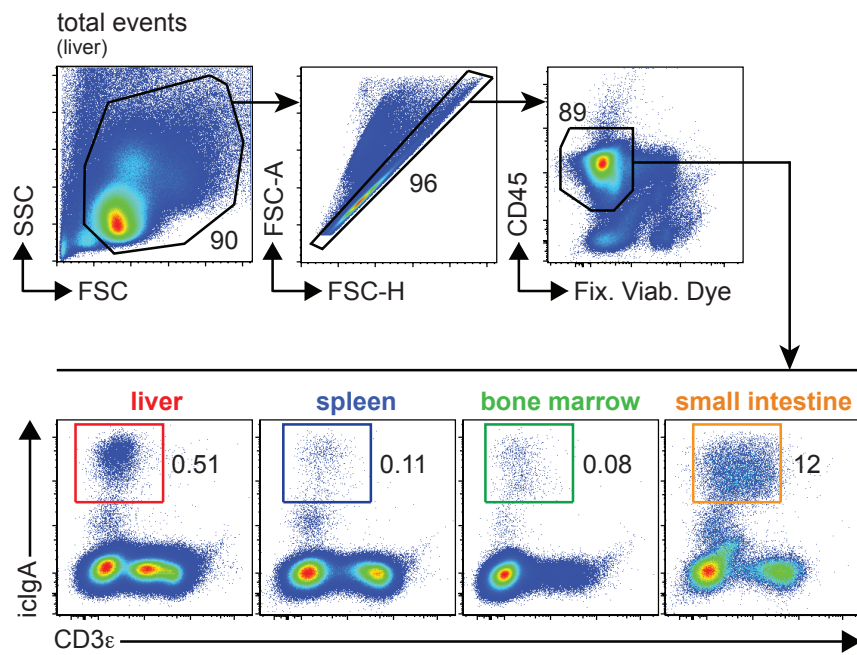
Supplemental Figure 1.

Liver IgA B cells harbor a memory phenotype. FCM analysis of viable CD45⁺ cells in liver (A) and Peyer's patches (B) at steady state. IgA^{int}B220⁺ cells were gated and analyzed for expression of CD80, CD73, CD138 and GL7. Liver IgA^{int}B220⁺ B cells essentially contain memory B cells (CD80⁺CD73⁺), while those from PP are mostly composed of GC cells (GL7⁺CD138⁺).



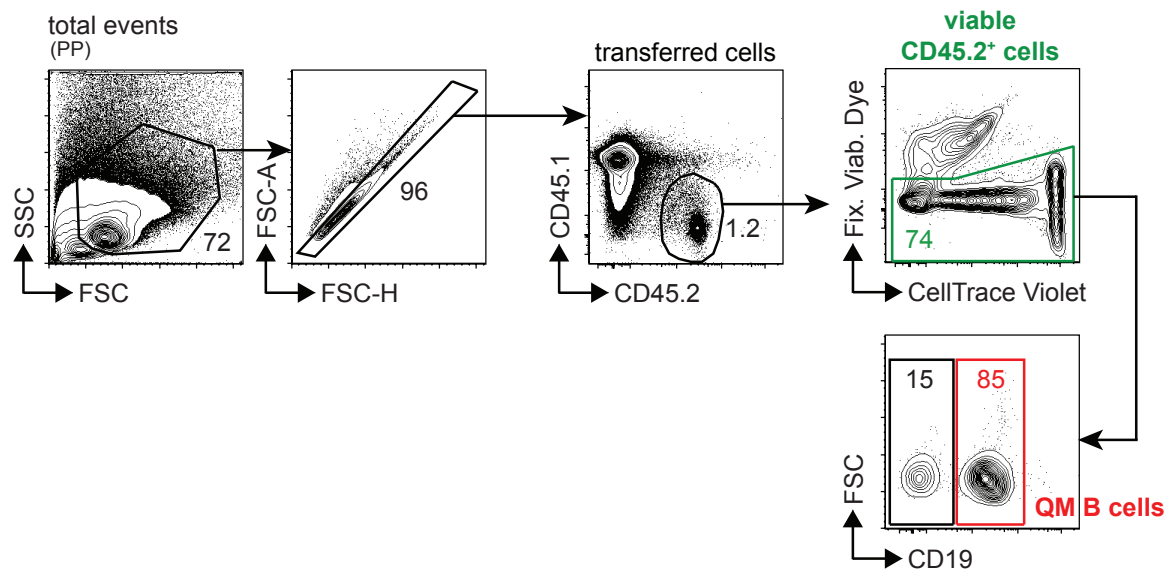
Supplemental Figure 2.

Liver IgA⁺CD138⁺ cells contain few apoptotic cells. (A) FCM analysis of Annexin-V expression in iclgA⁺CD138⁺ cells from liver, spleen and bone marrow at steady state revealing apoptotic cells (Annexin-V⁺Viab.Dye⁻) and dead cells (Annexin-V⁺Viab.Dye⁺). (B) Mean frequency \pm SEM of apoptotic iclgA⁺CD138⁺ cells (n=6). Data are representative of 1 out of 2 experiments. Mann-Whitney test: n.s: $p > 0.05$, * $p < 0.05$.



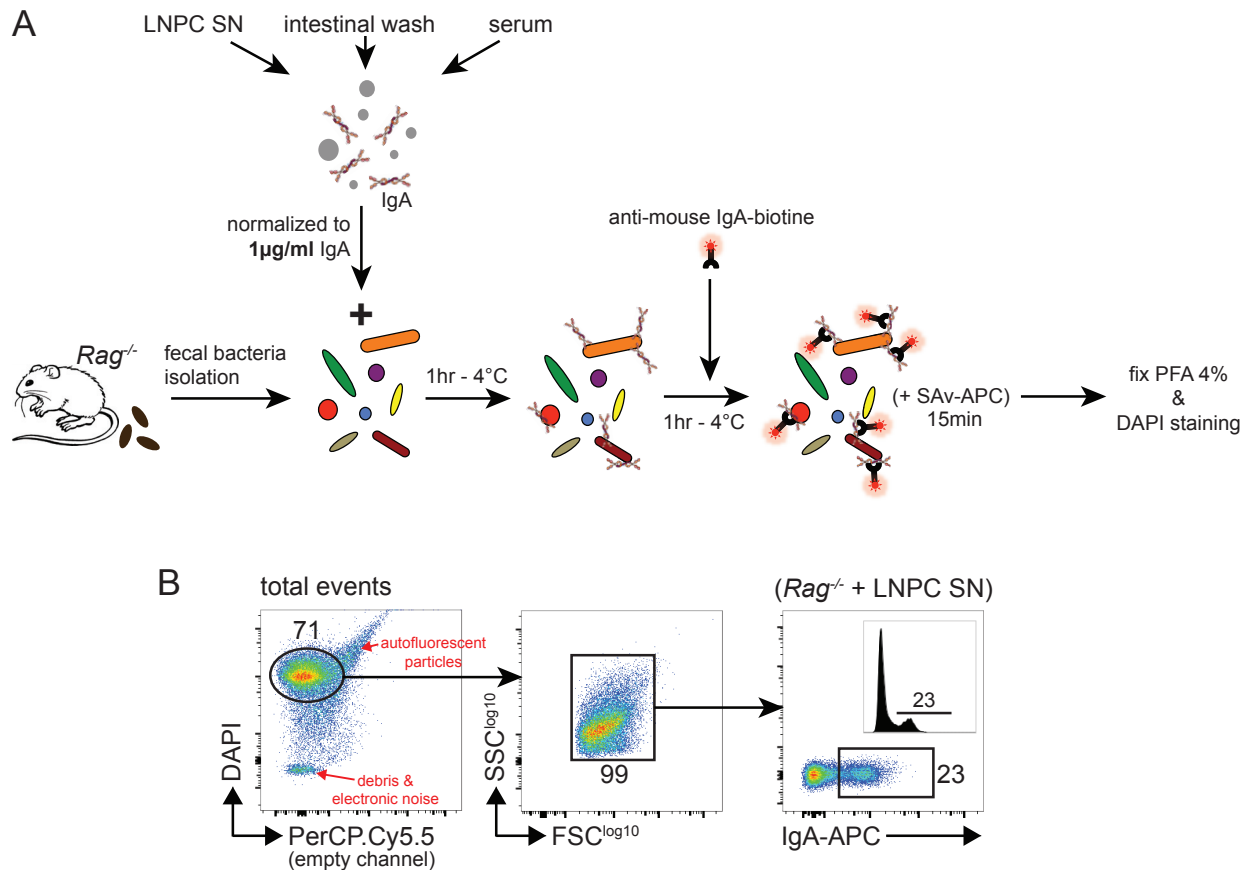
Supplemental Figure 3.

Gating strategy of IgA plasma cells in various organs. After a gating based on morphology and elimination of doublets, viable hematopoietic cells (CD45⁺Viab.Dye⁻) were analyzed for expression of surface of CD3 and intracytoplasmic IgA. IgA plasma cells were identified as icIgA⁺CD3⁻ cells.



Supplemental Figure 4.

Gating strategy to identify donor B cells in recipients of QM cells. 10^7 spleen cells from QM mice (CD45.2), previously stained with CellTrace Violet, were transferred i.v. into CD57BL/6-Ly5.1 recipients (CD45.1) before oral immunization with NP-FicolI and CT. 3-6 days later, FCM is used to track donor B cells in various organs. After a gating based on morphology and elimination of doublets, transferred cells are identified as CD45.2⁺CD45.1⁻ cells and viable cells are gated as CTV⁺Viab.Dye⁻ cells. Finally, QM B cells are identified as CD19⁺ cells among CD45.2⁺CD45.1⁻ viable donor cells.



Supplemental Figure 5.

Experimental approach to evaluate the capacity of IgA from various sources to bind commensal bacteria. (A) Illustration of the procedure. Serum, intestinal wash and liver non-parenchymal cells 36 hrs LNPC culture supernatant were diluted to reach 1µg/ml IgA and incubated for 1 hr with isolated fecal bacteria from *Rag^{-/-}* mice. After extensive washing, anti-mouse IgA-biotine was added for 1 hr, followed by streptavidin-APC for 15 min. Bacteria were finally fixed with 4% PFA for 1 hr and stained for DNA content with 2.5µg/ml DAPI-PBS. (B) Autofluorescent particles were excluded using an empty channel (PerCP.Cy5.5) and bacteria were gated as DAPI⁺ events and analyzed for IgA staining.

DISCUSSION

1. Les pDC ne sont pas nécessaires à la mise en place de la réponse IgA intestinale en conditions non-infectieuses

Au delà de leur rôle reconnu dans la lutte antivirale, de par leur forte capacité de production d'interferons de type I suite à l'engagement de leurs récepteurs de l'immunité innée (TRL7/9), les pDC ont été depuis quelques années reconnues pour jouer d'autres rôles majeurs dans la réponse immunitaire, y compris son versant humoral (Cerutti et al., 2005; Jegou et al., 2003). Une étude récente démontre justement que les pDC sont nécessaires *in vivo* au développement de la réponse IgA spécifique de rotavirus, un virus à tropisme intestinal (Deal et al., 2013). En 2011, Tezuka *et al.* montrent *in vitro* que les pDC des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques ont la capacité d'induire la commutation isotypique vers IgA sur un mode TI, lorsque cultivées avec des lymphocytes B naïfs (Tezuka et al., 2011b), proposant ainsi un rôle des pDC dans la réponse IgA en situation non-infectieuse.

Mon premier travail de thèse a consisté à explorer plus en détail l'implication potentielle des pDC dans la réponse IgA non-infectieuse. Dans un premier temps, nous avons souhaité reproduire les tests de co-culture pDC-lymphocytes B naïfs, en comparant des pDC issues de différents tissus, y compris le foie. En effet, l'équipe d'accueil a montré que ces cellules sont particulièrement enrichies dans le foie, et jouent un rôle majeur dans l'induction de la tolérance orale (Goubier et al., 2008), un processus souvent associé à l'induction d'une réponse IgA. Nous avons donc réalisé des expériences de co-culture de lymphocytes B naïfs (isolés sur la base de l'expression d'IgD) et de pDC provenant du GALT et du foie, ou de cDC. Malgré de nombreux essais et la comparaison de différentes conditions expérimentales, nous n'avons pas pu reproduire les données de la littérature concernant l'induction d'IgA. Dans nos mains, la production d'IgA dans ce système a nécessité obligatoirement la présence d'un stimulus (anti-CD40 ou CpG-1668), tandis que nous n'avons pas retrouvé la capacité des pDC à promouvoir plus efficacement la commutation vers IgA que les cDC (toutes deux provenant du GALT).

Nous formulons ainsi l'hypothèse que les résultats obtenus dans cet article puissent être en partie dus à des artéfacts liés au travail *in vitro*. Principalement, la possibilité que les fractions purifiées mises en co-culture soient contaminées avec des cellules produisant des IgA. En effet, les pDC isolées à partir du GALT, qui contient de nombreux précurseurs de plasmocytes à IgA qui partagent

des marqueurs membranaires communs avec les pDC (B220, Ly6C). De la même façon, les fractions de lymphocytes B pourraient contenir une quantité infime mais suffisante de plasmocytes à IgA pour fausser les résultats. L'observation d'une production d'IgA de l'ordre d'une centaine de ng/ml par des lymphocytes B « naïfs » cultivés sans stimulus et sans pDC, et l'absence de témoin pour la fraction « pDC seules » dans l'étude de Tezuka *et al.* vont dans ce sens. Dans ces deux cas de figure, les pDC pourraient stimuler les cellules IgA⁺ contaminantes ou favoriser leur survie, ayant ainsi un impact direct sur le taux d'IgA dans les cultures.

Ces observations *in vitro* nous ont donc amené à nous poser la question de la réelle contribution *in vivo* de ces cellules dans la réponse IgA intestinale en conditions non-infectieuses. Nous avons ainsi montré, grâce à deux modèles murins déficients pour les pDC, que ces cellules ne sont pas nécessaires à l'induction et l'expression des réponses IgA intestinales. En effet, l'absence des pDC, que ce soit sur une courte (modèle BDCA2-DTR) ou une longue période (modèle CD11c^{Cre}E2-2^{fllox}), n'altère ni la prolifération des lymphocytes B et le processus de commutation isotypique vers IgA dans le GALT, ni la différenciation terminale des plasmocytes sécréteurs d'IgA et leur sécrétion dans la muqueuse. De plus, des tests d'incorporation de BrdU *in vivo* montrent que le renouvellement des plasmocytes à IgA intestinaux n'est pas altéré en absence de pDC (**Figure 30**). Par ailleurs, l'immunisation par voie orale avec un antigène TI ainsi que l'utilisation de souris déficientes en lymphocytes T CD4 nous ont permis de montrer que la réponse IgA TI n'est pas non plus modifiée en l'absence de pDC. Tezuka *et al.* ayant proposé que la capacité d'induction de la réponse IgA par les pDC soit médiée par leur expression membranaire de BAFF et APRIL, il serait désormais intéressant de vérifier ces résultats et de déterminer *in vivo* si la déplétion des pDC induit des modifications systémiques pour ces cytokines clés de la réponse IgA TI.

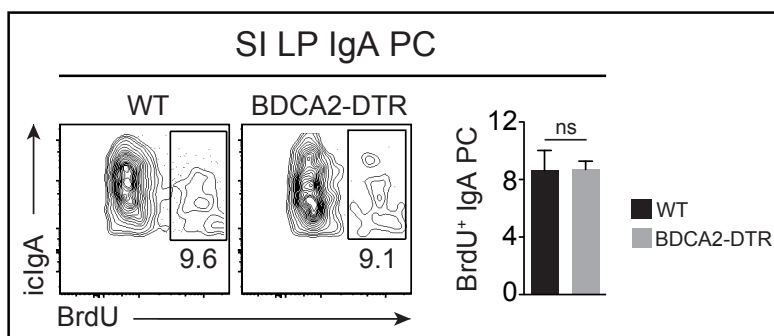


Figure 30. Le renouvellement de la population de plasmocytes à IgA de l'intestin n'est pas affecté en l'absence de pDC.

Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de plasmocytes à IgA (icIgA⁺CD19⁺) ayant intégré du BrdU dans l'intestin grêle de souris WT et BDCA2-DTR traitées avec de la toxine diphtérique (Analyse à J+7 après le début de l'apport de BrdU).

Pour résumer, nos résultats indiquent que, à l'homéostasie ainsi qu'après immunisation orale avec des antigènes non-infectieux, les pDC ne jouent pas de rôle essentiel dans l'initiation des réponses IgA dans le GALT et la survie des plasmocytes à IgA dans la muqueuse intestinale. Nous proposons

donc que, si les pDC semblent avoir un rôle critique dans l'induction d'une réponse IgA suite à une infection virale intestinale (Deal et al., 2013), elles ne sont pas essentielles pour la réponse IgA intestinale ni à l'homéostasie, ni après immunisation orale avec des Ags non-infectieux. Cette réponse IgA pourrait être donc être induite par une autre sous-population de DC, ou impliquer différents types cellulaires exerçant des fonctions redondantes. Ainsi, si plusieurs études démontrent - principalement *in vitro* - le rôle potentiel de plusieurs sous-populations de DC dans la mise en place de la réponse IgA intestinale, l'implication respective de chacune de ces sous-populations reste à élucider *in vivo*.

2. Le foie est un site effecteur de la réponse IgA intestinale

Il y a maintenant plus de 30 ans, Manning *et al.* démontrent pour la première fois chez le rat que le foie constitue un site important de synthèse d'anticorps (Ac). Ils constatent alors que le foie contient en moyenne 10 à 20 fois plus de cellules productrices d'Ac que la rate ou le sang, et que ces Ac sont majoritairement des IgA (Manning *et al.*, 1984). Les années suivantes, plusieurs études menées chez le rat et la souris montrent qu'une immunisation par voie orale ou systémique entraîne l'apparition de cellules productrices d'IgA spécifiques de l'antigène dans le foie (Altorfer *et al.*, 1987; Carter *et al.*, 1989; Wu, 1992). Les auteurs concluent alors de ces découvertes que cette production locale participe à l'apport d'IgA dans la bile, en parallèle du mécanisme de transport hépatobiliaire, ces IgA étant ensuite relarguées dans le duodénum. Cependant, de nombreuses questions restent toujours en suspend, comme l'origine des cellules productrices d'IgA du foie, les mécanismes qui leur permettent d'être retenues dans le foie, la spécificité de ces IgA et leur rôle à la fois localement et pour l'immunité intestinale.

Le lien fonctionnel étroit entre le foie et l'intestin, aussi bien sur le plan métabolique qu'immunitaire, a été particulièrement étudié durant ces 20 dernières années, avec notamment la démonstration d'un rôle essentiel du foie dans la clairance des endotoxines d'origine intestinale (Fox *et al.*, 1989; Mimura *et al.*, 1995; Treon *et al.*, 1993) ou dans l'induction de la tolérance orale envers des antigènes alimentaires (Goubier *et al.*, 2008). Avec ce travail de thèse, nous apportons une nouvelle composante à l'axe entéro-hépatique en démontrant qu'une partie des cellules de l'immunité humorale générées dans le GALT, et produisant des IgA dirigées contre des antigènes intestinaux, se localisent dans le foie.

2.1. CARACTERISATION DES CELLULES PRODUCTRICES D'IgA DANS LE FOIE

Malgré l'engouement relativement récent portant sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules immunitaires du foie (cellules de Kupffer, NKT, sous-populations de lymphocytes T), les cellules de la lignée lymphocytaire B ont été très peu étudiées. Chez la souris, nous avons mis en évidence une population importante de lymphocytes B naïfs matures représentant jusqu'à 25% des lymphocytes intra-hépatiques (**Figure 31**). Notre attention s'est portée sur la population de plasmocytes (PC), représentant environ 1% des lymphocytes du foie, dont 75% produisent des IgA, et présentant un phénotype immature singulier. En effet, ils

expriment fortement le marqueur de prolifération Ki-67 et le CD138, tandis que les marqueurs de lymphocyte B CD19 et B220 sont faiblement retrouvés, les différenciant ainsi des plasmablastes sanguins (sur lesquels ces derniers marqueurs restent en partie exprimés). Leur expression significative de molécules de CMH de classe II ainsi que le CD80 en font néanmoins des plasmablastes à part entière. L'expression à faible niveau du principal facteur de transcription plasmocytaire Blimp-1 confirme cette classification. Ils se différencient ainsi distinctement des deux autres principales populations de plasmocytes à IgA, à savoir le contingent intestinal et médullaire, qui eux présentent les caractéristiques de PC matures. Malgré la mise en évidence de ce phénotype immature, nous démontrons que les plasmablastes à IgA hépatiques possèdent une capacité de sécrétion remarquable, semblable aux plasmocytes à IgA spléniques et intestinaux, tandis que les plasmocytes médullaires semblent posséder une capacité de sécrétion supérieure, certainement favorisée par un microenvironnement permettant leur survie (niches médullaires) et le développement complet de leur capacité sécrétoire.

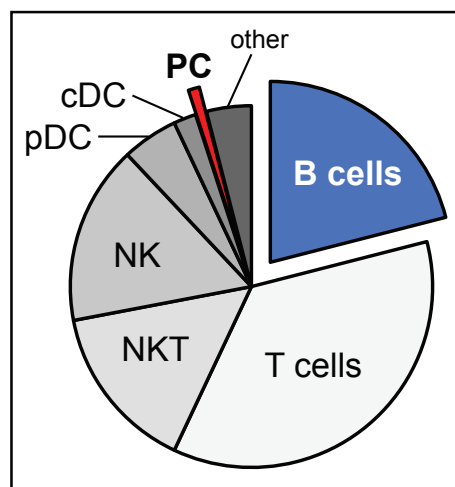


Figure 31. Répartition des cellules immunitaires infiltrant le foie chez la souris (hors cellules de Kupffer).

Afin de déterminer si ces observations pouvaient être étendues à l'Homme, nous avons analysé les cellules de marges saines (tissu anapathologiquement et immunologiquement « normal ») de résections de métastases hépatiques de carcinome colorectal. Nous avons ainsi observé que la lignée lymphocytaire B représente environ 5% des leucocytes hépatiques. Si cette proportion apparaît bien inférieure que chez la souris, il est à noter que plus de la moitié de ces cellules arborent un phénotype plasmocytaire. La large prédominance des plasmocytes à IgA observée dans le foie chez la souris est beaucoup moins marquée chez l'homme, avec une répartition plus équilibrée des plasmocytes à IgA et à IgG. Ainsi, si la population de cellules sécrétrices d'IgA reste systématiquement légèrement prédominante, cet équilibre pointe du doigt l'importance potentielle des cellules productrices d'IgG dans le foie humain. Néanmoins, un impact de la pathologie cancéreuse sur cette répartition n'est pas à écarter. Il faut effectivement souligner que les patients ayant subi une résection de métastases hépatiques ont été traités en amont de la chirurgie par plusieurs cures de chimiothérapie afin de réduire au maximum la taille des métastases. Il est donc difficile d'exclure formellement un effet de ce traitement sur les populations de cellules immunitaires du foie. Néanmoins, la fréquence des différentes populations immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules de Kupffer...) mesurée dans notre étude est

comparable aux données de la littérature portant sur le foie sain (Racanelli and Rehmann, 2006), ce qui suggère que le contingent de plasmocytes à IgA que nous avons étudié reflète bien la population contenue dans le foie normal. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer, comme chez la souris, le stade de maturité et le statut prolifératif des cellules productrices d'IgA dans le foie humain.

2.2. ORIGINE DES PLASMABLASTES A IgA HEPATIQUES

Des expériences d'immunisation orale avec des antigènes modèles TD (toxine cholérique) et TI (NP-Ficoll) nous ont permis de démontrer que le foie constitue un site effecteur, et non un site inducteur, de la réponse IgA. Nous avons cherché à déterminer l'origine de cette réponse IgA hépatique en condition homéostatique et après immunisation orale grâce à l'utilisation de deux modèles murins transgéniques. La présence dans le foie à l'homéostasie d'une population importante de lymphocytes B naïfs matures et de plasmablastes à IgA, en plus d'un microenvironnement cytokinique favorable à la commutation isotypique vers IgA (IL-10 et TGF- β) nous ont amené à nous poser la question d'une potentielle induction *in situ* de la réponse IgA. Nous avons donc recherché des stades intermédiaires de différenciation du lymphocyte B dans le foie (« post-switched IgA B cells ») et investigué l'expression par les lymphocytes B de l'enzyme AID, indispensable au processus de commutation isotypique. Une population minoritaire de lymphocytes B exprimant IgA en surface est détectable dans le foie, mais ne présentent aucune caractéristique de lymphocytes B récemment activés, et correspond en fait à des cellules B mémoires, comme l'indique leur statut non-prolifératif et l'expression de CD80 et CD73 (Zuccarino-Catania et al., 2014). De plus, l'analyse de l'expression d'AID à l'homéostasie, à la fois par la recherche de transcrits par RT-PCR (**Figure 32**) et par l'utilisation d'un modèle murin transgénique rapporteur pour l'expression d'AID (AID-Cre-YFP), montre une expression restreinte aux plaques de Peyer et absente dans le foie. Ces données montrent donc que le foie ne constitue pas un site inducteur de la réponse IgA à l'homéostasie.

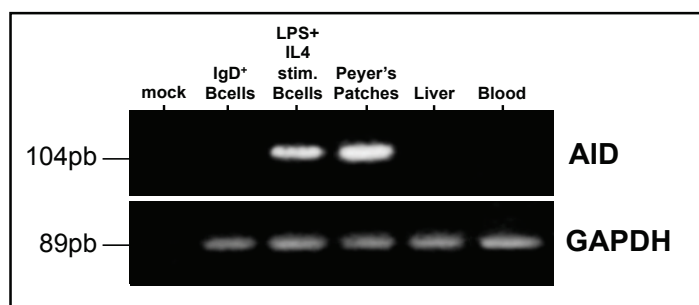


Figure 32.

Les transcrits AID sont indétectables dans le foie.

Les ARN sont isolés à partir de leucocytes issus du sang, du foie et des plaques de Peyer, rétrotranscrits, puis analysés pour la présence d'AID. Des lymphocytes B naïfs (IgD⁺) ou stimulés pendant 24h avec du LPS et de l'IL4 sont utilisés respectivement comme témoins négatif et positif.

D'autre part, nous avons montré que, suite au transfert de lymphocytes B transgéniques exprimant un BCR spécifique de l'antigène NP (souris QM), l'immunisation orale avec NP-Ficoll entraîne très rapidement la commutation isotypique des lymphocytes B QM vers IgA exclusivement dans les plaques de Peyer. Ce n'est que quelques jours après que des plasmablastes à IgA spécifiques de l'antigène sont détectés dans l'intestin et le foie, mais pas dans d'autres organes. De manière complémentaire, le modèle murin AID-Cre-YFP-ERT2, dans lequel il est possible d'induire l'expression conditionnelle et définitive d'YFP dans les cellules exprimant AID durant un traitement au tamoxifène, nous a permis de suivre la recirculation des plasmablastes à IgA générés dans les plaques de Peyer à l'état d'homéostasie et de montrer que la réponse IgA hépatique est initiée dans les plaques de Peyer.

Afin de démontrer de manière directe la migration des plasmablastes à IgA du GALT vers le foie, nous avons tenté d'utiliser le modèle murin Kaede (expression constitutive et ubiquitaire d'une protéine fluorescente photoconvertible par exposition à la lumière violette), qui est particulièrement adapté à l'étude des mobilités cellulaires *in vivo* (Schmidt et al., 2013; Tomura et al., 2010; 2008). En réalisant une laparotomie, nous avons exposé 4 à 6 plaques de Peyer à la lumière violette, et avons recherché les plasmablastes à IgA photoconvertis dans le foie dès 24h après l'opération. Hélas, le statut prolifératif des plasmablastes à IgA hépatique entraîne un renouvellement trop rapide de la forme non-convertie de la protéine Kaede, et ne nous a donc pas permis de tirer de conclusions dans ce modèle.

Ces différentes approches nous permettent donc d'affirmer que les plasmablastes à IgA hépatiques dérivent de lymphocytes B initialement activés dans le GALT, dont une partie se relocalise dans l'intestin, et une autre dans le foie. En d'autres termes, le foie constitue donc un site effecteur alternatif de la réponse IgA initiée dans le GALT, à la fois en contexte homéostatique et après immunisation orale. Bien entendu, il n'est pas exclu que le foie puisse constituer un site inducteur de la réponse IgA dans certains contextes pathologiques (infection, auto-immunité, cancer), en particulier suite à la formation de structures lymphoïdes tertiaires (Bach et al., 1992; Murakami et al., 1999).

Enfin, nos résultats mettent l'accent sur la dynamique particulière de cette population. En effet, nous montrons grâce au modèle AID-Cre-YFP-ERT2 qu'en seulement 6 jours, environ 10% du contingent des plasmablastes à IgA du foie est renouvelé (contre moins de 1% pour l'intestin). Des expériences d'incorporation de BrdU *in vivo* montrent également une acquisition très rapide du traceur par ces cellules, et une perte tout aussi rapide dès son élimination de l'eau de boisson, proposant qu'en plus de son intense prolifération, ce compartiment cellulaire semble être constamment et rapidement renouvelé. A la lumière des données de suivi cinétique de la réponse

IgA spécifique d'un antigène intestinal réalisé chez le rat et montrant une apparition rapide mais transitoire de cellules produisant des IgA spécifiques dans le foie (Altorfer et al., 1987), nous proposons le modèle suivant : le foie constitue un site effecteur précoce et transitoire de la réponse IgA, permettant de produire une première salve d'IgA avant la mise en place d'une réponse effectrice intestinale, plus longue à monter. Cela ouvre évidemment la question du devenir des plasmablastes à IgA hépatiques. L'analyse du marqueur d'apoptose Annexin-V nous a permis de voir que les plasmablastes à IgA présents dans le foie ne sont pas plus apoptotiques que leurs équivalents dans d'autres organes. Ainsi, le foie n'apparaît pas comme étant un lieu d'apoptose massive de ces cellules. De plus, leur état prolifératif et leur renouvellement rapide laisse penser que ces cellules ne meurent pas sur place, mais seraient plutôt vouées à recirculer jusqu'à d'autres organes comme l'intestin ou la moelle osseuse, abritant tous deux une forme plus mature de ces cellules. Cependant, comme discuté plus loin, l'étude des molécules de domiciliation exprimée par les plasmablastes à IgA du foie ne va pas en faveur de cette hypothèse. Pour finir, l'absence d'évidences proposant l'existence de niches de survie plasmocytaire dans le foie, similaires à celles présentes dans la moelle osseuse et caractérisées par la présence de types cellulaires particuliers exprimant des molécules d'adhésion et de survie particulières, renforce l'idée que le foie pourrait constituer un site effecteur transitoire de la réponse IgA.

2.3. HYPOTHESES SUR LES MECANISMES DE HOMING DES PLASMABLASTES A IgA DANS LE FOIE

Pendant leur activation dans le GALT, les lymphocytes T et B reçoivent un ensemble de signaux moléculaires entraînant l'induction de l'expression de combinaisons de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion qui permettront leur adressage tissulaire, ou domiciliation (« *homing* »). L'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A, produit en majorité par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques intestinales, a été identifié comme un acteur majeur dans l'induction de ces différentes molécules sur les lymphocytes du GALT, permettant leur adressage spécifique dans la muqueuse intestinale (CCR9 et $\alpha 4\beta 7$: intestin grêle / CCR10 et $\alpha 4\beta 7$: colon) (Agace and Persson, 2012; Johansson-Lindbom et al., 2003).

L'analyse de l'expression de molécules de domiciliation exprimées par les plasmablastes à IgA hépatiques a mis en évidence une forte expression de l'intégrine muqueuse $\alpha 4\beta 7$ et une très faible expression de CCR9. Alternativement, le CCR10 et le CXCR4, participant respectivement à la domiciliation des plasmocytes dans le colon (Brandtzaeg and Johansen, 2005) et la moelle osseuse (Chu and Berek, 2013), ne sont pas ou très peu exprimés. Ainsi, sur la base du profil d'expression

des molécules de domiciliation tissulaire, les plasmablastes à IgA hépatiques se différencient des plasmocytes à IgA intestinaux et médullaires, suggérant qu'il existe une voie spécifique de domiciliation hépatique pour ces cellules, impliquant entre autre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Il faut rappeler que MadCAM-1, le ligand de cette intégrine, peut être exprimé dans le foie, en particulier en conditions inflammatoires, et est impliqué dans le recrutement des lymphocytes T intestinaux dans les espaces portes hépatiques (Adams and Eksteen, 2006), zones dans lesquelles sont majoritairement localisées les cellules productrices d'IgA. En effet, des marquages immunohistochimiques sur coupes de foie humain normal, ainsi que des marquages immunofluorescents sur des coupes de foie murin ont révélé une localisation préférentielle de ces cellules dans les espaces portes.

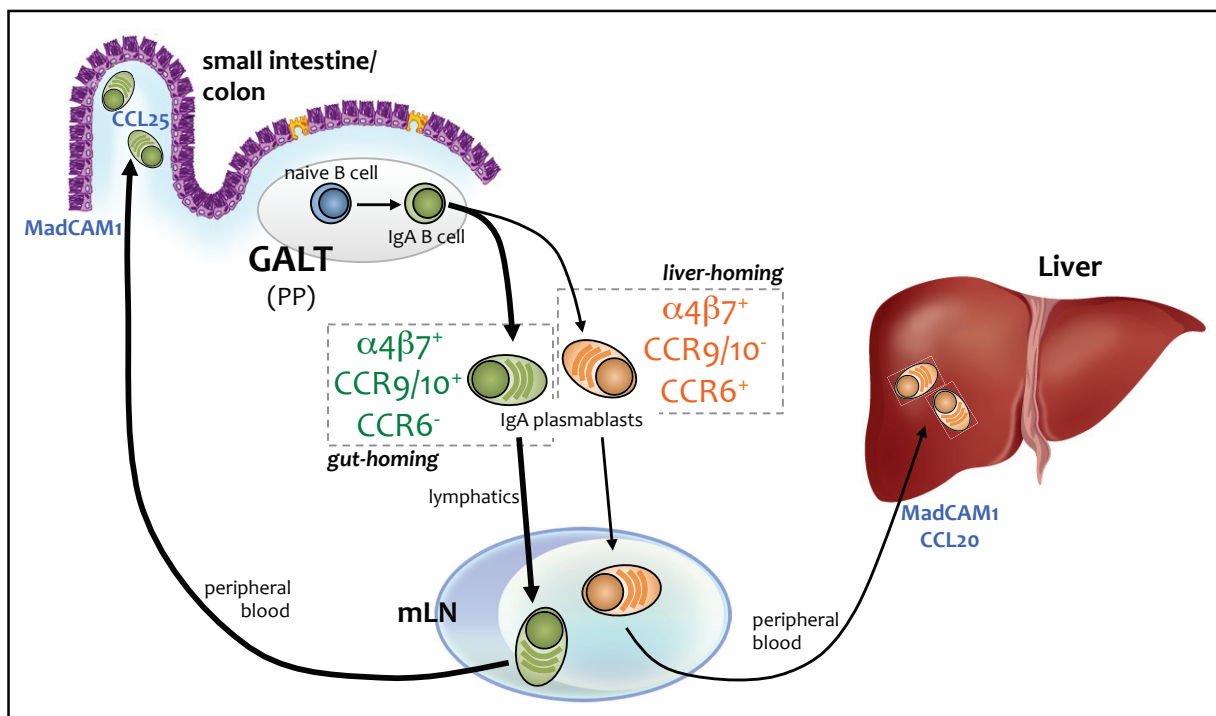


Figure 33. Hypothèses concernant la domiciliation dans le foie de plasmablastes à IgA générés dans le GALT.

Etant donné l'expression bimodale du CCR9 retrouvée dans la population de plasmablastes à IgA dans les ganglions mésentériques (données personnelles), nous proposons le modèle suivant : l'activation dans le GALT résulte en une population de plasmablastes à IgA hétérogène en terme d'expression de molécules de domiciliation, dont une partie co-exprime fortement $\alpha 4\beta 7$ et CCR9 ou CCR10, adressés respectivement à l'intestin grêle ou au colon, et une autre partie n'exprimant qu' $\alpha 4\beta 7$, mais pas CCR9 et CCR10, qui pourrait migrer préférentiellement dans le foie (**Figure 33**).

La domiciliation hépatique pourrait donc résulter d'une migration « par défaut » des plasmablastes à IgA n'exprimant pas les molécules nécessaires à la domiciliation intestinale (CCR9/10), ou d'un

mécanisme actif impliquant un ou plusieurs récepteurs de chimiokines. Peu de chose est connu sur les récepteurs de chimiokines impliqués dans la domiciliation des leucocytes dans le foie. Néanmoins, le CXCR6 a été reconnu comme un acteur majeur dans la rétention des NKT dans le tissu hépatique (Geissmann et al., 2005), mais nous n'avons pas détecté d'expression de ce récepteur de chimiokine ni sur les plasmablastes à IgA nouvellement générés dans les plaques de Peyer (données personnelles), ni sur les plasmablastes à IgA hépatiques. Nous avons par ailleurs obtenu des résultats préliminaires suggérant que CCR6 puisse être impliqué dans la domiciliation hépatique des plasmablastes à IgA. Ce récepteur de chimiokine, exprimé assez largement par les cellules de l'immunité (monocytes/macrophages, cellules dendritiques immatures, lymphocytes T et B), interagit avec la chimiokine CCL20 (aussi connue sous le nom de MIP-3 α et de LARC, pour « Liver Activation Regulated Chemokine ») exprimée majoritairement dans le foie, les poumons, le dôme des plaques de Peyer et les tissus inflammés (Baba et al., 1997; Hieshima et al., 1997). L'expression de CCR6 a notamment été décrite sur les lymphocytes B naïfs et mémoires (Krzysiek et al., 2000). Par ailleurs, si de façon générale cette expression est perdue lors de la différenciation en plasmablaste, jusqu'à 15% des plasmablastes à IgA sanguins expriment CCR6 (Kunkel et al., 2003), tout comme la grande majorité de ces mêmes cellules dans les plaques de Peyer (données personnelles – **Figure 34a**).

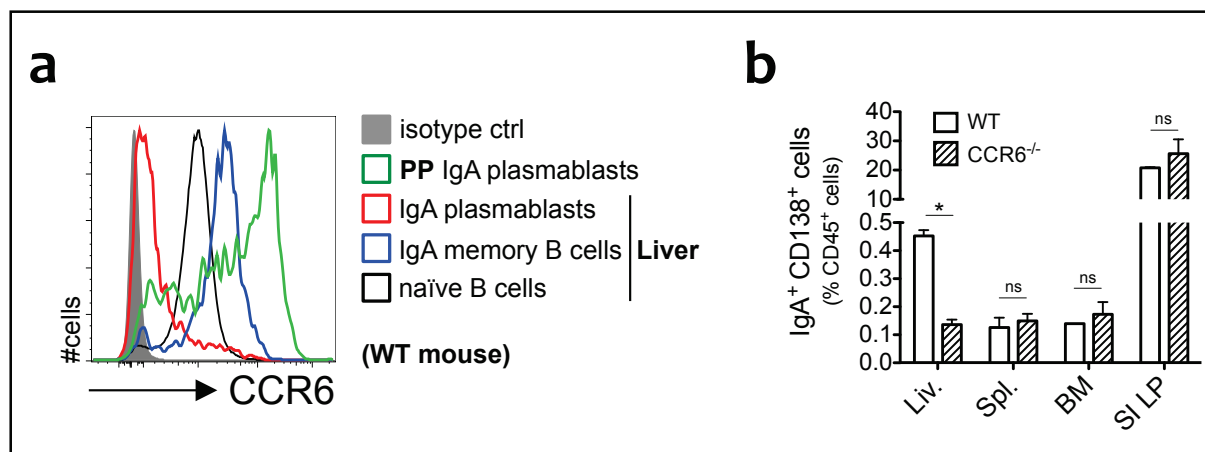


Figure 34. Le contingent hépatique de plasmablastes à IgA est sélectivement affecté chez les souris CCR6^{-/-}.

(a) Analyse de l'expression de CCR6 par différentes cellules issues de souris WT montrant que les plasmablastes à IgA hépatiques (ligne rouge) n'expriment pas cette molécule, contrairement aux lymphocytes B naïfs (ligne noire) et aux lymphocytes B mémoires à IgA (ligne bleue) du foie, et aux plasmablastes à IgA des PP (ligne verte). (b) Fréquence moyenne de cellules IgA⁺CD138⁺ dans différents organes de souris WT et CCR6 déficientes, montrant une diminution significative du contingent de plasmablastes à IgA sélectivement dans le foie.

Une étude montre également que la réponse IgA spécifique d'un virus à tropisme intestinal (rotavirus) est largement affectée chez la souris CCR6-KO (Cook et al., 2000), confirmant

l'implication de ce récepteur de chimiokine dans la mise en place d'une réponse IgA efficace, ici en contexte infectieux. De manière intéressante, nous montrons à l'homéostasie une nette diminution de la fréquence des plasmablastes à IgA dans le foie de souris déficientes pour CCR6 comparativement aux souris contrôles, tandis que les populations de plasmocytes à IgA de l'intestin, de la moëlle osseuse et de la rate ne sont pas modifiées à l'homéostasie (**Figure 34b**), suggérant l'implication sélective de CCR6 dans la migration des plasmablastes à IgA dans le foie.

Cependant, tandis que les lymphocytes B matures naïfs et mémoires à IgA du foie expriment CCR6 (comme dans d'autres organes), la majorité des plasmablastes à IgA hépatiques n'expriment pas ce récepteur (**Figure 34a**). On pourrait alors émettre l'hypothèse que la domiciliation hépatique de certains plasmablastes sanguins (générés dans le GALT) via l'interaction de CCR6/CCL20 soit suivie d'une perte d'expression de ce récepteur de chimiokine.

L'implication de la voie CCR6/CCL20 dans la domiciliation hépatique des plasmablastes à IgA nécessite des expériences complémentaires. Par exemple, il serait intéressant de déterminer si les plasmablastes à IgA CCR9⁻CCR10⁻ retrouvés dans le GALT et le sang expriment CCR6 et migrent en réponse à CCL20, permettant ainsi de distinguer effectivement la population à tropisme intestinal (CCR9⁺/CCR10⁺α4β7⁺CCR6⁻) de la population potentiellement adressée au foie (CCR9⁻/CCR10⁻α4β7⁺CCR6⁺) (**Figure 33**). Parallèlement, le co-transfert *in vivo* de cellules de plaques de Peyer isolées de souris WT et CCR6-KO, préalablement marquées à l'aide de traceurs fluorescents distincts, pourrait permettre de confirmer l'implication de ce récepteur de chimiokine dans le homing hépatique en mesurant la capacité de relocalisation hépatique respective des plasmablastes à IgA contrôles versus CCR6⁻.

2.4. ROLE DES IGA PRODUITES DANS LE FOIE

La littérature ancienne suggère que les IgA produites localement dans le foie pourraient principalement alimenter la bile (en plus du transport hépatobiliaire des IgA sériques), afin de compléter la production d'IgA dans la partie supérieure de l'intestin grêle (Altörfer et al., 1987; Brown et al., 1982; Manning et al., 1984). Cette réponse pourrait ainsi jouer un rôle important dans le contrôle de la flore commensale et de défense contre les pathogènes, notamment dans les stades précoces d'infection.

En accord avec les données obtenues chez le rat par Altörfer et al., nous avons observé que l'immunisation orale des souris avec un Ag bactérien TD (toxine cholérique) induit l'apparition rapide et transitoire, quasi-sélectivement dans le foie de cellules productrices d'IgA spécifiques de l'antigène. Une immunisation de rappel avec cet Ag induit de nouveau une réponse IgA hépatique,

tandis qu'une réponse effectrice majeure est mise en place dans la muqueuse intestinale. Alternativement, l'immunisation orale avec un Ag modèle polysaccharidique TI (NP-Ficoll) induit une réponse IgA concomitante dans le foie et l'intestin, d'une intensité comparable. Ces résultats suggèrent que la réponse IgA hépatique rapide pourrait avoir un rôle protecteur essentiel dans les phases précoces d'une infection, avant la mise en place plus tardive de la réponse effectrice intestinale. Par ailleurs, cette réponse hépatique pourrait également jouer un rôle plus spécifique pour la neutralisation d'agents infectieux à tropisme hépatique (virus : hépatites B, C... ; bactéries : *helicobacter hepaticus* ; parasites : schistosome, plasmodium).

Une question importante concerne la spécificité des IgA produites dans le foie à l'homéostasie. La majeure partie des IgA intestinales est dirigée contre des composés de la flore commensale, dont une fraction significative (20 à 30%) est recouverte par ces IgA (van der Waaij et al., 1996; 1994). Ces IgA jouent un rôle majeur dans le maintien de la flore normale, en créant un réseau d'agglutination empêchant sa translocation à travers la muqueuse (exclusion antigénique), mais également en participant au maintien de l'équilibre des espèces constituant la flore normale (Kawamoto et al., 2014). Nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour analyser la réactivité des IgA produites par les plasmablastes à IgA hépatiques contre des bactéries de la flore commensale fécale. Pour cela, nous avons isolé les bactéries fécales issues de souris Rag2-KO, dépourvues d'IgA en surface du fait de l'absence totale de lymphocytes T et B. Nous avons pu mettre en évidence que les IgA provenant des surnageants de culture de leucocytes hépatiques se fixent très efficacement aux bactéries fécales, de la même façon que les IgA contenues dans les fluides intestinaux, tandis que les IgA sériques ont une capacité de fixation bien plus réduite. Ces résultats indiquent donc qu'une partie des IgA produites dans le foie est dirigée contre des composés bactériens de la flore commensale, à l'image des IgA produites dans l'intestin. Il serait maintenant d'intérêt de tester la réactivité des IgA hépatiques humaines par le même procédé expérimental via l'utilisation de d'espèces bactériennes représentatives de la flore bactérienne retrouvée chez l'Homme (Benckert et al., 2011).

La production d'IgA par les plasmablastes hépatiques, situés dans les espaces portes, c'est à dire la zone d'entrée du flux sanguin dans les sinusoides, pourrait donc participer à la neutralisation et la clairance des composés microbiens d'origine intestinale arrivant de façon chronique dans le foie. La formation de complexes immuns avec le LPS pourrait réduire ses effets pro-inflammatoires sur les cellules du parenchyme hépatique (qui expriment pour la plupart le TLR4), tout en facilitant sa clairance par les cellules de Kupffer. En effet, il a été démontré que les cellules de Kupffer humaines expriment le récepteur Fc α RI, leur permettant d'éliminer les complexes immuns IgA-antigène plus efficacement que via le TLR4 par exemple (van Egmond et al., 2000). Par ailleurs, seules les IgA monomériques sont capables de médier ce mécanisme, à l'inverse d'IgA polymériques ou

sécrétoires, suggérant que ce mécanisme intervienne préférentiellement avec les IgA sériques, qui sont majoritairement monomériques chez l'Homme. Sur la base de nos résultats, nous proposons donc que les IgA hépatiques, compte tenu de leur plus grande capacité de fixation aux bactéries par rapport aux IgA sériques, pourraient contribuer significativement à ce mécanisme de clairance et ainsi participer activement au maintien de l'homéostasie locale (**Figure 35**).

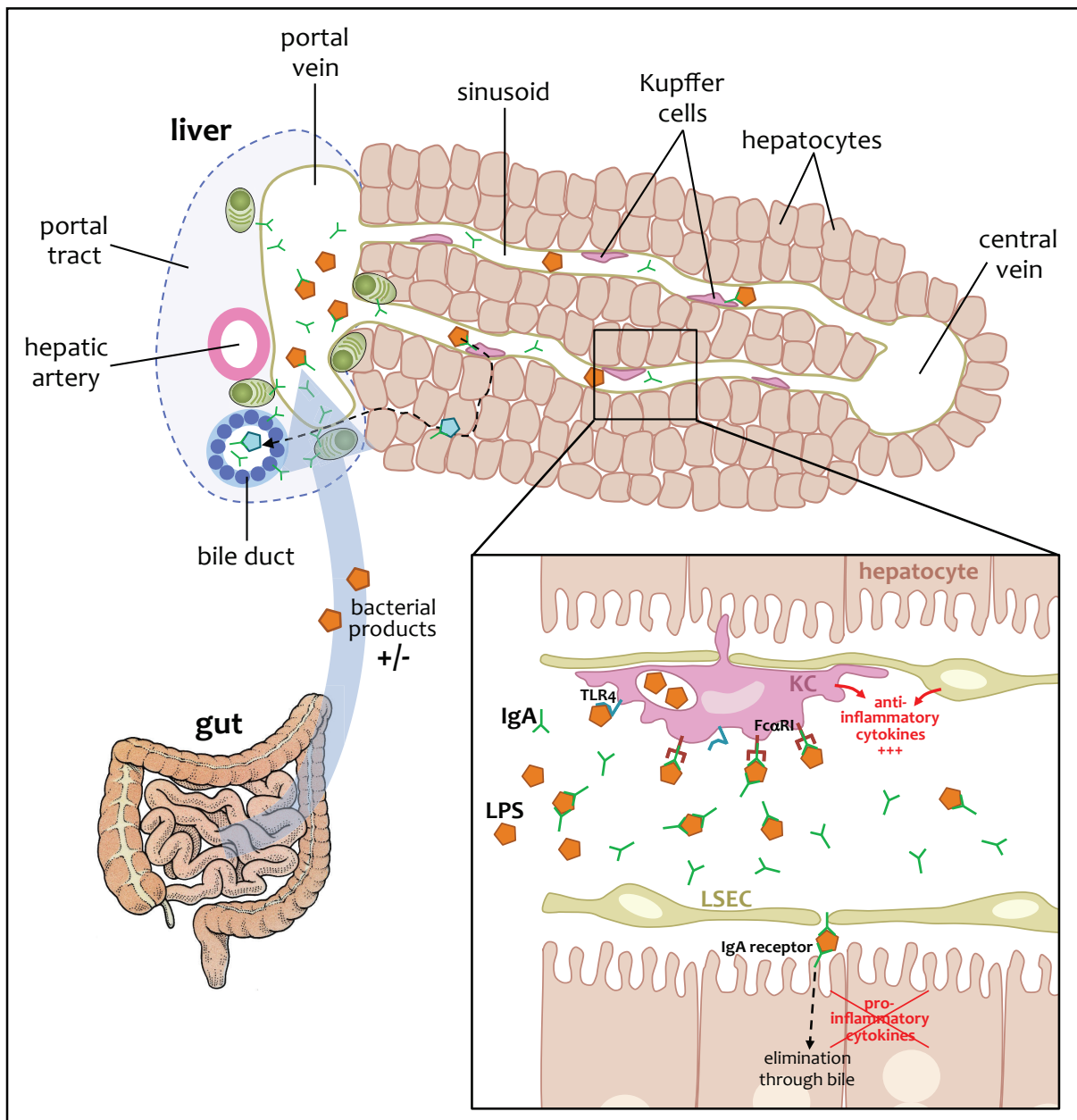


Figure 35. Hypothèses sur le rôle des IgA hépatiques dans la clairance du LPS d'origine intestinale.

Les plasmablastes à IgA, localisés dans les espaces portes drainant l'intestin, produisent des IgA dirigées contre des composants de la flore bactérienne intestinale. Ces IgA pourraient participer à l'élimination du LPS en favorisant sa prise en charge par les cellules de Kupffer (menant à sa dégradation), et en permettant aux hépatocytes de l'éliminer en reconnaissant les IgA du complexe immunitaire, limitant ainsi la stimulation de TLR4 et la production de cytokines pro-inflammatoires.

Pour tester expérimentalement ce rôle anti-inflammatoire des IgA hépatiques, nous pourrions comparer la capacité de bactéries fécales incubées ou non avec des IgA hépatiques à être phagocytées par des cellules de Kupffer et à induire la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires. L'utilisation d'un cytomètre d'image permettrait à la fois de vérifier la localisation des bactéries dans les cellules de Kupffer et d'en déterminer leur nombre. Même si un équivalent murin du Fc α RI n'a pas encore été identifié, il se peut que ce mécanisme implique un autre type de récepteur aux IgA. Dans ce sens, l'utilisation de cellules de Kupffer provenant de souris déficientes pour les différents récepteurs aux IgA ou l'utilisation d'Ac neutralisants permettrait d'identifier celui ou ceux impliqués dans les effets observés.

De façon intéressante, nous avons également observé que les plasmablastes et les plasmocytes à IgA conservent l'expression d'un BCR membranaire. Compte tenu du fait que chez l'Homme, les plasmocytes à IgA et IgM médullaires conservent un BCR membranaire capable de signaler après stimulation antigénique (Pinto et al., 2013), il est possible que les antigènes microbiens arrivant par la veine porte puissent stimuler, via l'engagement de leur IgA membranaire, les plasmablastes hépatiques et favoriser leur sécrétion d'anticorps, leur survie, voire la production de cytokines (cf publication annexe : Blanc *et al.*, en préparation).

Enfin, par delà leur capacité d'interaction avec l'antigène, les IgA hépatiques pourraient également contribuer à l'acquisition d'une propriété tolérogène chez les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) hépatiques. En effet, les CPA hépatiques présentent des caractéristiques immatures et pro-tolérogènes, dont l'acquisition est en grande partie liée au microenvironnement cytokinique anti-inflammatoire du foie (présence de TGF- β , RA, IL-10...). Il est possible que les IgA hépatiques contribuent à l'induction et/ou au maintien de ce phénotype tolérogène via des récepteurs aux IgA, comme Fc α RI dont l'engagement sur les DC ou les monocytes entraîne la production d'IL-10 et l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 (Lecocq et al., 2013; Pasquier et al., 2004). Dans le même sens, l'engagement de SIGN-R1 (équivalent murin du DC-SIGN) par des IgA sécrétoires diminue la sensibilité des DC à la stimulation par les TLRs et leur confère des propriétés tolérogènes via la production d'IL-10 et la capacité à générer des lymphocytes T régulateurs (Diana et al., 2013). Du fait que la nature moléculaire des IgA (monomérique, polymérique, sécrétoire) conditionne leur capacité de liaison aux différents récepteurs et la nature de la réponse cellulaire, il apparaît important de déterminer la nature des IgA hépatiques chez la souris et chez l'Homme.

2.5. LA REPONSE IgA HEPATIQUE EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE

De nombreuses atteintes pathologiques du tube digestif ou du foie engendrent une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (atteintes inflammatoires aiguës ou chroniques du tube digestif, atteintes des voies biliaires), conduisant à une translocation accrue des bactéries intestinales à travers la muqueuse et un taux anormalement élevé de composés bactériens dans le sang. Ces composés bactériens contribuent significativement au développement de l'inflammation hépatique et de la fibrose (Balmer et al., 2014; Jirillo et al., 2002; Nolan, 1989), via des mécanismes dépendants de TLR4 en grande majorité (Inokuchi et al., 2011; Lin et al., 2012; Seki et al., 2007). Par ailleurs, les patients atteints d'hépatopathie alcoolique (ALD) présentent des anomalies spécifiques de la réponse IgA (van de Wiel et al., 1987b), se traduisant principalement par une élévation significative des IgA sériques (van de Wiel et al., 1988; Wilson et al., 1969) et l'apparition de dépôts d'IgA dans les sinusoides hépatiques (Amano et al., 1988; van de Wiel et al., 1987a). Outre une évolution vers la cirrhose, voire le carcinome hépatocellulaire si le patient ne stoppe pas sa consommation d'alcool, la présence de complexes immuns IgA-Ag dans le sang prédispose les personnes atteintes d'ALD à développer des pathologies secondaires, comme la néphropathie à IgA (Amore et al., 1994; Lhotta, 2002). Malgré les nombreuses études descriptives associant les IgA et l'hépatopathie alcoolique, l'origine de ces IgA n'a jamais été clairement déterminée, et est devenue une question d'intérêt commun pour l'hépatologue et le néphrologue (Wyatt and Julian, 2013).

Afin d'étudier l'effet de la consommation d'alcool sur la réponse IgA hépatique, nous avons utilisé un modèle murin d'ALD créé par le NIAAA (*National Institute for Alcoholism and Alcohol Abuse*), et impliquant la consommation d'une faible dose d'éthanol pendant 10 jours, suivie de l'administration d'une dose importante le 11^{ème} jour (« chronic plus binge ») (Bertola et al., 2013). Nos expériences ont permis de mettre en évidence l'apparition d'une atteinte hépatique (stéatose, élévation des transaminases hépatiques dans le sérum), et d'observer pour la première fois chez la souris une augmentation des IgA sériques et l'apparition de dépôts dans les sinusoides, deux caractéristiques typiques de la pathologie humaine. De façon intéressante, ces perturbations sont corrélées à une augmentation significative et sélective de la population de plasmablastes à IgA hépatiques, tandis que les plasmocytes à IgA intestinaux sont fortement diminués.

Pour étudier l'implication des plasmablastes à IgA hépatiques dans la pathologie alcoolique et ses désordres systémiques, nous avons analysé l'effet du FTY720. Nous avons en effet observé que le traitement par cette drogue entraîne la rétention des plasmablastes à IgA dans les plaques de Peyer à l'homéostasie et leur quasi-disparition du foie après quelques jours de traitement. De façon très intéressante, ce traitement permet de prévenir l'augmentation des IgA sériques, la formation

de dépôts dans les sinusoides, et améliore de façon tout à fait remarquable la pathologie hépatique. Ces observations indiquent que l'augmentation du contingent de plasmablastes hépatiques due à la consommation chronique d'éthanol, et entraînant une surproduction d'IgA dans le foie, est certainement responsable de l'apparition des perturbations liées aux IgA observées dans cette maladie (**Figure 36**).

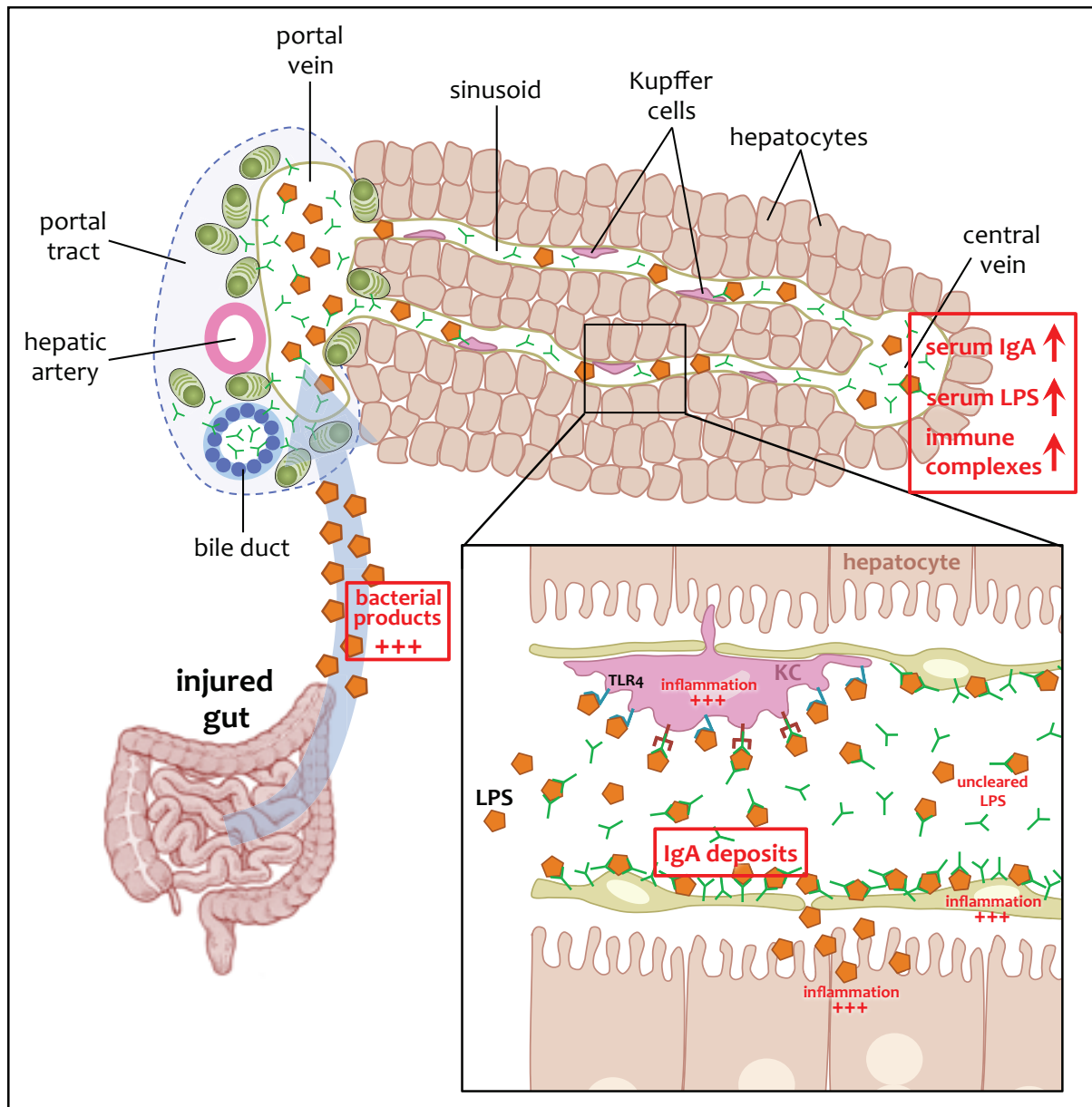


Figure 36. L'augmentation de la production d'IgA dans le foie pourrait contribuer au développement de dépôts dans les sinusoides hépatiques et à l'augmentation des IgA sériques.

Cette hypothèse est à mettre en parallèle d'une étude très ancienne chez l'Homme montrant que les patients atteints d'hépatopathies d'origine alcoolique présentent un nombre augmenté de « cellules contenant des IgA » dans le foie, qui corrèle par ailleurs au taux d'IgA sérique (Hadziyannis et al., 1969). Il serait nécessaire aujourd'hui de confirmer à l'aide d'outils actuels

l'augmentation du contingent de cellules sécrétrices d'IgA dans le foie de patients atteints d'ALD et de réaliser des comparaisons avec des patients atteints d'hépatopathies d'autres étiologies.

A ce stade, il est encore difficile de conclure sur un rôle pathologique potentiel de l'augmentation du contingent de plasmablastes hépatiques suite à la consommation d'alcool. L'augmentation des IgA sériques et hépatiques pourrait également n'être que le reflet d'une altération des fonctions hépatiques induites par la pathologie, réduisant entre autre le transport hépatobiliaire des IgA sériques. Néanmoins, de telles baisses de la fonction hépatique ne devraient pas être observées dans ce modèle d'ALD. Par ailleurs, nous avons également observé que le taux d'IgG sériques n'est pas modifié par la pathologie, montrant que l'augmentation des IgA dans le sérum ne résulte pas d'une augmentation générale de la réponse immunitaire humorale systémique. L'utilisation de souris déficientes pour IgA permettrait de déterminer l'implication ou non des IgA dans le développement de la pathologie, même si cela ne permettra pas de conclure sur le rôle spécifique des IgA hépatiques. Quoi qu'il en soit, l'augmentation du taux d'IgA sérique pourrait favoriser le développement d'une pathologie secondaire.

Par ailleurs, le FTY720 ne possède pas une action spécifique des plasmablastes à IgA et peut empêcher également l'arrivée dans le foie de cellules pro-inflammatoires, comme les polynucléaires neutrophiles par exemple. Dans ce sens, quelques études ont déjà démontré l'action bénéfique du FTY720 sur le développement d'hépatopathies non-alcooliques (Yin et al., 2012), notamment via le blocage du recrutement de cellules inflammatoires mésenchymateuses d'origine médullaire (Kong et al., 2014). Dans tous les cas, nos données démontrent que le FTY720 a également des effets bénéfiques remarquables sur le développement de la pathologie hépatique liée à l'alcool et, via son action sur la recirculation des plasmablastes à IgA, pourrait prévenir les complications comme la néphropathie secondaire à IgA. Des études complémentaires sont nécessaires pour décrypter précisément les mécanismes biologiques mis en jeu lors du traitement de l'hépatopathie alcoolique par le FTY720.

De manière intéressante, une étude récente a démontré que la chimiokine CCL20, surexprimée dans le foie et le sang des patients atteints d'hépatopathie alcoolique, joue un rôle essentiel dans le développement des atteintes hépatiques induites par le LPS (Affò et al., 2014), suggérant l'implication du couple CCR6-CCL20 dans l'ALD. Compte tenu de cette observation et de nos résultats préliminaires sur le rôle de CCR6 dans la migration des plasmablastes à IgA dans le foie, il serait intéressant d'utiliser des souris CCR6-KO pour préciser l'implication de ce récepteur de chimiokine dans notre modèle murin d'ALD, et ainsi identifier les populations cellulaires (en plus des plasmablastes à IgA) dont le recrutement dans le foie est altéré.

De la même manière, le développement de modèles murins transgéniques engendrant la délétion la plus spécifique possible des plasmablastes à IgA hépatiques permettrait l'analyse précise du rôle de ces cellules et des IgA qu'elles produisent dans le maintien de l'homéostasie locale et leur contribution dans l'immunité intestinale. A court terme, le modèle d'ALD que nous avons utilisé pourrait ainsi permettre d'adresser la question du rôle des IgA hépatiques dans la clairance des composés bactériens d'origine intestinale.

Les évidences chez l'Homme d'un lien entre IgA et ALD nous ont amené à nous concentrer quasi-exclusivement sur cette pathologie. Néanmoins, comme cité précédemment, d'autres types de pathologies hépatiques comme la cholangite sclérosante primitive, sont caractérisées par un afflux anormal de composés bactériens causés par une augmentation de la perméabilité intestinale et pourraient être liées à des altérations de la réponse IgA intra-hépatique. Ainsi, il serait intéressant d'analyser la réponse IgA intrahépatique dans des modèles murins mimant ce type de pathologie (administration de CCl₄, ligature des voies biliaires). Par ailleurs, même s'il n'existe pas d'évidence de l'initiation d'une réponse IgA locale lors d'infections virales hépatiques, l'utilisation de modèles mimant les hépatites virales aiguës, notamment via l'utilisation de ConA, pourrait permettre d'étudier le rôle potentiel des plasmablastes à IgA du foie.

Nous avons eu l'occasion d'analyser, en collaboration avec le groupe de M.C. Michallet, les populations immunitaires hépatiques dans le cadre d'études métaboliques chez des souris sous régime enrichi en graisses (« *High Fat Diet* », HFD). Ce type de régime induit chez la souris une obésité associée à une forte stéatose hépatique et la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le foie.

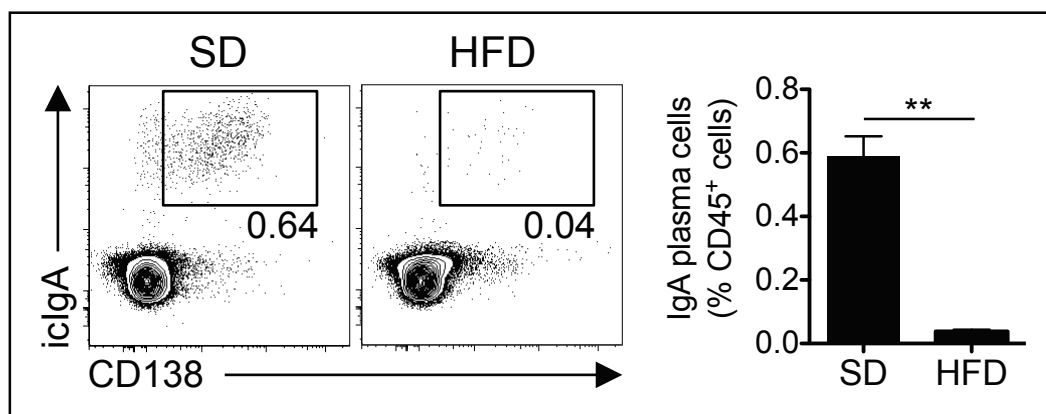


Figure 37. La population de plasmablastes à IgA du foie est fortement diminuée chez des souris sous régime enrichi en graisses.

Analyse par cytométrie en flux de la fréquence de plasmablastes à IgA (IgA⁺CD138⁺) parmi les cellules CD45⁺ du foie de souris C57BL/6, sous régime normal (Standard Diet : SD) ou sous régime enrichi en graisses (High Fat Diet : HFD). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Nos résultats indiquent que les cellules immunitaires du foie les plus impactées chez ces souris sont les plasmablastes à IgA, qui sont presque totalement absents (**Figure 37**). Cependant, l'impact de ce traitement sur les populations plasmocytaires de l'intestin ou de la moelle osseuse n'a pas été étudié à ce jour. Les données de la littérature sur le sujet sont très rares, et contradictoires. Si une étude montre chez le rat une légère augmentation des IgA sériques et fécales induite par ce régime (Okazaki et al., 2011), une autre étude menée chez la souris montre une diminution significative des IgA spécifiques de l'ovalbumine (OVA) dans le sérum des souris sous HFD, dans le cadre d'expériences d'induction de tolérance orale à l'OVA (Mito et al., 2006). Il est donc difficile à l'heure actuelle d'émettre des hypothèses sur la raison de la diminution drastique du contingent de plasmablastes à IgA hépatiques, et son impact systémique sur les IgA. Ces résultats préliminaires nécessiteraient d'être complétés, notamment par l'étude des autres compartiments plasmocytaires, des taux d'IgA dans le sérum et les fluides intestinaux, de l'initiation de la réponse IgA dans le GALT, etc.

PUBLICATIONS ANNEXES

« Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge. »

Pascal Blanc, Ludovic Moro-Sibilot, Ferdinand Jagot, Simon De Bernard, Laurent Buffat, Sebastien Dussurgey, Morgan Taillardet, Olivier Thauvat, Antoine Sicard, Laurent Genestier, Stephen Nutt & Thierry Defrance.

Manuscrit en préparation

Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge

Pascal Blanc¹⁻⁵, Ludovic Moro-Sibilot¹⁻⁵, Ferdinand Jagot¹⁻⁵, Simon De Bernard⁶, Laurent Buffat⁶, Sébastien Dussurgey⁷, Morgan Taillardet¹⁻⁵, Olivier Thaumat¹⁻⁵, Antoine Sicard¹⁻⁵, Laurent Genestier¹⁻⁵, Stephen Nutt⁸ & Thierry Defrance¹⁻⁵

Affiliations.

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie-International Center for Infectiology Research, Lyon, France.

² INSERM, U1111, Lyon, France.

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁴ Université Lyon 1, Lyon, France

⁵ CNRS, UMR 5308, Lyon, France

⁶ AltraBio SAS, 69007, France

⁷ INSERM SFR Biosciences Gerland, US8/UMS3444, Tour INSERM CERVI, 69365 Lyon Cedex 07, France

⁸ The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Vic., Australia Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Parkville, Vic., Australia nutt@wehi.edu.au.

Correspondence.

Thierry Defrance, CIRI – Inserm U1111, CRNS UMR5308, ENS Lyon, UCBL

21 Avenue Tony Garnier 69365 LYON Cedex 07

e-mail: thierry.defrance@inserm.fr

tel: (+33) 4 37 28 23 95

Condensed title.

Antigen sensing by long-lived plasma cells

Total characters: 37 551 (excluding figures)

ABSTRACT

The dogma holds that plasma cells (PC), as opposed to B cells, are no longer able to bind antigen (Ag) because they have switched from expression of a membrane-bound Ag receptor (mBCR) to production of the secreted form of the BCR (antibodies). We have compared the phenotypical and functional attributes of bone marrow (BM) PC generated by NP-dextran or NP-KLH, the T-cell-dependent (TD) and T-cell-independent (TI) forms of the hapten NP, respectively. We show that TI NP-specific BM PC retain expression of a mBCR and an Ag-binding capacity comparable to that of B cells while their TD counterparts do not. This unexpected characteristic is unrelated to Ag structure but is a specific feature of IgM-expressing PC, which are prominent in response to TI Ag. We demonstrate that IgM⁺ BM PC are fully mature and that their mBCR is signalling-competent. Finally, we show that Ag boost *in vivo* induces modulation of the IgM⁺ PC gene expression profile and initiates a cytokine production program, characterized in particular by induction of CCL5 and IL-10. Altogether, our results demonstrate that IgM-expressing mature BM PC can sense Ag and acquire competence for cytokine production upon antigenic challenge.

INTRODUCTION

Plasma cells (PC) have long been considered as short-lived effectors that are eliminated as the immune response vanishes. This view has been challenged by the demonstration by the groups of A. Radbruch (Manz et al., 1997) and R. Ahmed (Slifka et al., 1998) in the late nineties that T-cell-dependent (TD) protein antigens (Ag) could generate long-lived PC mainly located in the bone marrow (BM). These seminal contributions brought the disruptive concept of memory PC capable of secreting protective antibodies (Abs) long after eradication of the pathogen or at distance of immunization, in a vaccinal context. We and others, brought evidence that generation of long-lived PC is not restricted to TD Ag but can also be achieved by prototypic T-cell-independent (TI) Ag such as bacterial capsular polysaccharides (Taillardet et al., 2009; 2010; Foote et al., 2011; Bortnick et al., 2012). Furthermore, we have documented that the anti-pneumococcal immunity conferred by a polysaccharidic vaccine heavily relies on long-lived TI memory PC (Taillardet et al., 2009). One of the most enduring paradigm in the field of B cell biology holds that PC have definitely switched-off expression of the membrane-bound form of the Ag receptor (mBCR) to produce its secreted version, i. e. Abs. This paradigm is largely grounded in the demonstration that B cells and PC identities are maintained by an opposing set of transcription activators and repressors. The two most prominent members of this genetic network are: i) Pax-5, one of the key element responsible for B cell commitment during hematopoiesis (Horcher et al., 2001) and ii) Blimp-1 (B Lymphocyte Induced Maturation Protein), a transcriptional repressor usually referred to as the master regulator of PC differentiation (Shaffer et al., 2002; Shapiro-Shelef et al., 2003). Blimp-1 promotes PC differentiation largely through direct repression of Pax-5 (Lin et al., 2002) while Pax-5 directly represses XBP-1 (X box Binding Protein-1), a transcriptional activator which controls the secretory machinery of PC (Reimold et al., 1996).

A previous study we conducted with the TD and TI forms of the PS3 pneumococcal capsular polysaccharide had unexpectedly revealed that PS3-specific TI BM PC failed to experience the profound contraction of their pool size undergone by their TD counterparts in the first two months post-immunization (Taillardet et al., 2009). This finding pointed towards the possibility that life and death decisions in the memory PC compartment may also be governed by the nature of the antigenic signals received by B cells early on during the PC differentiation process. The cellular and molecular mechanisms that drive TD and TI Ab responses are fundamentally distinct. In particular, BCR signaling has long been known to be qualitatively different for TD and TI Ag. The recent study of Zeng et al. (Zeng et al., 2014) has recently shed new light on this issue by demonstrating that TI Ag have the unique capacity to induce upregulation of endogenous retrovirus RNAs that activate the (MAVS)- and cGAS-cGAMP-STING-dependent cytosolic RNA and DNA-sensing pathways. Altogether,

these findings led us to explore whether TD and TI Ag could initiate distinct developmental programs that lead to PC with divergent functional attributes.

We report here that NP-specific mature BM PC generated by NP-dextran (the TI form of the hapten (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl) express a functional mBCR while their TD counterparts (generated in response to NP-KLH) do not. We establish that maintenance of a mBCR on PC is not determined by the structure of the Ag (TI versus TD) that initiated their development but is associated with expression of the IgM isotype. Finally we demonstrate that antigenic challenge *in vivo* modulates their gene expression profile and initiates a cytokine production program characterized by up-regulation of CCL5/RANTES and IL-10 expression. In conclusion, IgM-expressing mature PC constitute a unique population with a dual PC/B cell identity that fully expresses its Ab-secretion function but has also conserved certain B cell attributes and Ag-sensing capacity.

RESULTS AND DISCUSSION

Bone marrow plasma cells generated by NP-dextran express both the membrane-bound and the secreted form of the BCR. Our initial aim was to compare the gene expression profile of TD and TI NP-specific plasmablasts (PB). Because these early PC are known to retain some expression of surface Igs (slgs) (Jourdan et al., 2009), we assumed that NP-specific PB could be gated thanks to the binding of the phycoerythrin (PE)-conjugated form of NP (NP-PE). Fig. 1 A and B illustrate the binding of NP-PE by splenic PB and BM PC of *Blimp^{gfp/+}* mice at different time points after immunization. At day 5 in the spleen, TD and TI NP-specific PB (gating shown in Fig. S1 A) display the same levels of NP-binding. However, analysis of NP-PE stainings on BM PC at later time points unexpectedly revealed that the NP-binding capacity of TI BM PC increased between day 5 and day 15 and remained stable thereafter up until day 180 post-immunization. By contrast the NP-binding capacity of NP-specific TD BM PC steadily declined between day 5 and day 30 and was consistently 6 to 8 fold lower than that of their TI counterparts whatever the time point considered (Fig. 1, A and B). Analysis of the frequency of polyclonal Ab-secreting cells (all ASCs) and NP-specific ASCs in sorted NP-PE⁺ and NP-PE⁻ BM PC demonstrated that both TD and TI NP-binding PC are *bona fide* ASCs and that NP binding correlates with the ability of PC to secrete NP-specific Abs (Fig. 1 C). As shown in Fig. 1 D, the density of expression of surface lambda light chains (the predominant light chain isotype associated with anti-NP Abs) by TD NP-specific PC followed the same trend as NP-binding, and was on average 8 times lower than that of NP-specific TI PC. We then monitored the levels of expression of the membrane and secreted heavy chain Ig transcripts in TD and TI NP-specific PC and splenic B cells by Q RT-PCR. Fig. 1 E shows that NP-specific TD PC followed the commonly accepted rule, i. e. expressed high levels of the $\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and $\gamma 3$ secreted transcripts while poorly expressing the membrane form of these transcripts. NP-specific TI PC displayed a strikingly different profile inasmuch as: i) they expressed high levels of both the secreted and the membrane form of the μ transcript (comparable to those expressed B cells for the latter), ii) the γ heavy chain secreted transcripts were only marginally represented. The heavy chain mRNA profiles of TD and TI NP-specific PC were coherent with their pattern of Ig isotypes production (Fig. 1 F) and with the fact that IgM is by far the prominent Ig isotype secreted in response to TI Ag. Together, these findings demonstrate that NP-specific TI BM PC constitute an atypical PC population that shares with B cells expression of a membrane-bound Ag receptor.

Bone marrow plasma cells generated by NP-dextran exhibit features of mature plasma cells. PB are generally defined as actively-dividing Ig-secreting cells that express

intermediate levels of Blimp-1 (Kallies et al., 2004) but have not yet completely lost expression of B cell markers such as CD19, MHC class II and slgs (Jourdan et al., 2009). Because of their poor biodegradability, polysaccharidic Ag may be retained in the organism for long periods of time (Humphrey, 1981) leading to a prolonged wave of PB production. It was thus of crucial importance to determine whether the NP-binding ASCs we analyzed in the BM after NP-dextran immunization fulfill or not the definition of PB. Two sets of experiments were carried out to address this question. First, we compared the levels of Blimp-1, as assessed by the MFI of GFP expression, in TD and TI splenic PB and BM PC. As shown in Fig. 2 A and B, Blimp-1 expression peaks in BM PC at day 30 post-immunization for the two antigenic forms of NP. At this time point, TI and TD BM PC expressed comparable levels of Blimp-1 that were on average 5 (TD PC) to 10 (TI PC) times superior to those expressed by splenic PB. This finding indicates that from day 30 post-immunization onwards, both NP-specific TI and TD PC are Blimp-1^{hi}, a phenotypic trait that is evocative of mature PC. We next investigated the proliferative status of BM NP-specific TI PC at early (8 days) and late (32 days) time points after immunization, using an *in vivo* BrdU pulse/chase strategy combined with Ki67 staining. As a positive control, BrdU and Ki67 stainings were concomitantly assessed in the Ly6c^{hi}/CD11b⁺ compartment enriched for monocyte (MO) and macrophage (MP) progenitors and known to be subject to constant renewal in the BM. BM PC and MO/MP progenitors were gated as illustrated in Fig. S1 C. All NP-specific BM PC (Fig. 2 C) and MO/MP progenitors (Fig. 2 D) were BrdU-labeled at day 8, indicating that both cell types had been actively dividing during the 8 days of the BrdU pulse. At day 32 post-immunization, MO/MP progenitors were mostly BrdU⁻ indicating that they had continued to divide during the chase period of the experiment. By contrast, all NP-specific PC were still BrdU-labelled, suggesting that little subsequent division had occurred in this population during the 24 days that separated the arrest of BrdU feeding from BrdU staining analysis. The pattern of Ki67 expression was consistent with the BrdU staining results inasmuch as both PC and MO/MP progenitors were mostly Ki67⁺ at day 8 while only PC became Ki67⁻ at day 32 post-immunization (Fig. 2, C-E). Altogether, these results indicate that by day 32 post-immunization, NP-specific BM PC have a slow turnover rate and have not been replaced by newly-formed PC possibly generated from proliferating precursors during the BrdU chase period. Hence, from day 32 post-immunization onwards, NP-binding TI BM PC constitute a mature PC population. Since they also retain a high NP-binding capacity up to 180 days post-immunization (Fig. 1 B), it is unlikely that they originate from a long-lasting ongoing TI immune response. It is noteworthy that the group of Kearney also reported that immunization with dextran (the polysaccharidic carrier of the immunogen used in our study) induces a population of long-lived resting BM PC resistant to a cyclophosphamide treatment (Foote et al., 2011).

The multiple targets of Pax-5 include genes that are involved in BCR signaling such as CD79a/Ig α and Blnk or that behave as BCR activation co-receptors such as CD19 (McManus et al., 2011). IgM cannot be transported to the surface in the absence of the Ig α /Ig β heterodimer (Hombach et al., 1990). Therefore, the high expression of Blimp-1 in TI BM PC and its expected negative impact on Pax-5 and Ig α expression is apparently at odds with the maintenance of surface Igs at high density on these cells. To get insight into these contradictory findings, we analyzed expression of Pax-5 and of two of its direct targets (Ig α and CD19) in polyclonal splenic B cells and NP-specific TD and TI PB and PC. In agreement with the pattern of Blimp-1 expression in PB and PC (Fig. 2 A), Pax-5 and CD19 are strongly repressed in both TD and TI NP-specific PB and PC as compared to B cells (Fig. 2F and G). By contrast, expression of Ig α in PC is less drastically affected, the average reduction of the MFI of the Ig α staining histograms for TD and TI PC being around 40 % as compared to B cells (Fig. 2 G). Although unexpected, this finding is in agreement with the study of Pinto and colleagues describing expression of sIgs by IgM- and IgA-expressing human PC (Pinto et al., 2013). Even more puzzling is the observation that CD19 and Ig α are differentially affected by the strong down-regulation of their transcriptional regulator in PC. A possible explanation is that the regulatory sequences of CD19 and Ig α are recognized by Pax-5 with varying affinity, a phenomenon previously documented for the transcription factors of the ETS family (Hollenhorst et al., 2007). The higher representation of strong Pax-5 binding sites within the Ig α promoter could explain why expression of this gene is selectively maintained in PC when Pax-5 availability becomes limiting. It is also possible that active and repressive histone marks are differentially expressed at promoter chromatin for Ig α and CD19 in PC thus keeping the former but not the latter gene in an open configuration. Further studies will be required to clarify this point.

The membrane BCR expressed by bone marrow plasma cells generated by NP-dextran is functional. To determine whether the mBCR expressed by TI BM PC generated by NP-dextran is able to transduce a signal, we first concentrated on the Ig α /Ig β heterodimer. We had shown that Ig α is expressed at comparable levels in TD and TI BM PC (Fig 2 G) but we could not determine what fraction of the Ig α pool is located at the PC membrane because our anti-Ig α mAb recognizes an intra-cytoplasmic epitope of the molecule. This could be achieved for Ig β /CD79b because the mAb used for staining recognizes an extracellular epitope of the molecule. As shown in Fig. 3 A, TD NP-specific PC almost lacked surface Ig β expression while their TI counterparts strongly expressed Ig β . We next examined the impact of *in vitro* Ag stimulation on tyrosine phosphorylation of the Syk kinase and its substrate, the

adaptor molecule Blnk/SLP65, that are both receptor-proximal signal transducer elements of the BCR. The gates used for the phosflow assays are shown in Fig. S1 D. We observed that *ex vivo* stimulation of B cells and TI PC with NP-dextran induced phosphorylation of Syk and Blnk in NP-binding cells but not in non NP-binding cells. By contrast, TD PC (regardless of their capacity to bind NP-PE) showed very little detectable p-Blnk and virtually no p-Syk staining upon stimulation with NP-dextran (Fig. 3, B and C). Similar results were obtained after *in vitro* stimulation with NP-KLH (not shown).

To further document the signaling ability of the mBCR expressed by NP-specific TI PC, we examined its capacity to mobilize Ca^{++} after *in vitro* ligation. Gatings for the Ca^{++} mobilization assays are shown in Fig. S1 E. As illustrated by Fig. 3 D, prior labeling with NP-PE did not prevent NP⁺ B cells from mobilizing Ca^{++} in response to either NP-dextran, goat anti-IgM Abs or ionomycin. NP⁺ B cells responded well to the surrogate Ag and ionomycin but, as expected, did not raise their intracellular Ca^{++} levels in response to NP-dextran stimulation. No Ca^{++} signal above threshold was observed in any of the cell population analyzed in response to the control Ab. *In vitro* stimulation with ionomycin, NP-dextran and anti-IgM Abs but not with the control Ab also induced Ca^{++} mobilization in NP⁺ TI BM PC. Conversely, only ionomycin was able to significantly induce Ca^{++} mobilization in NP⁻ TI BM PC. Unresponsiveness of NP⁻ TI PC to anti-IgM Abs is most likely due to the paucity of IgM-expressing PC in the BM (15 to 30% of the BM PC pool), IgA being by far (50 to 70% of the BM PC pool) the predominant Ig isotype expressed by BM PC at the steady-state (data not shown).

Finally, TI PC were incubated with APC-conjugated polystyrene beads coated with NP-OVA and subsequently stained with Abs against LAMP-1 (to visualize late endosomes) and phospho-Erk (a downstream kinase mostly activated in the endosomes), to monitor Ag internalization. Cells were next examined for co-localization of Ag-coated beads, LAMP-1 and p-Erk (Fig. 3 E). On average, 6 % of the analyzed GFP⁺ PC exhibited internalized Ag particles for which the red fluorescence of the Ag-coated beads co-localized with the LAMP-1 and p-Erk stainings generating a bright signal. This percentage is coherent with the representation of NP-specific PC amongst the enriched BM PC population. Collectively, the aforementioned observations provide evidence that the mBCR expressed by TI BM PC is signaling-competent and promotes both the early and late events of the BCR signaling cascade when it is engaged.

Expression of a functional membrane BCR on bone marrow plasma cells is correlated with expression of μ heavy chains. In the mouse, IgM-expressing PC are prominent among the memory PC compartment elicited by polysaccharidic Ag with only a minor

contribution of switched PC belonging to the IgG3 or IgA isotypes (Taillardet et al., 2009; Foote et al., 2011). Conversely, when administered subcutaneously, TD Ag mainly give rise to IgG-secreting memory PC and only to a few long-lived IgM-expressing PC. The pattern of Ig isotype expression by NP-specific TI and TD PC was in accordance with this paradigm inasmuch as the former were mostly IgM⁺ while the latter were predominantly IgM⁻ (Fig. 1 E and Fig. 4 A). Interestingly, NP-PE stainings conducted on early TD PB revealed two intensities of NP-binding on these cells: high for IgM⁺ PB, low for IgM⁻ PB (Fig. 4 A). This finding led us to examine the possible relationship between the nature of the Ig isotype produced by PC and their expression of a mBCR. Intracytoplasmic staining of TD BM PC with NP-PE, anti-IgG1 and anti-IgM mAbs discriminated three NP-specific PC populations: a small but detectable IgM-expressing subset, a substantial IgG1-expressing PC compartment and a large population of PC expressing neither IgM nor IgG1 (Fig. 4 B). Because subcutaneous NP-KLH immunization does not generate any detectable IgA-expressing PC in the BM (data not shown), the double negative PC population most likely consists of NP-specific ASCs expressing IgG subclasses other than $\gamma 1$ ($\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and $\gamma 3$). As illustrated by Fig. 4 B, NP-dextran as well as surrogate Ags induce Blnk phosphorylation in IgM-expressing NP-specific TD PC but not in the IgG-expressing ones.

To further explore the link between Ig isotype expression and maintenance of a functional mBCR on PC, we switched to AID^{-/-} mice. Due to invalidation of the AID gene that controls the class switch recombination and somatic hyper mutation processes, these mice produce only unmutated IgM Abs upon immunization. As illustrated by Fig. 4 C, TD and TI PC generated in AID^{-/-} mice exhibited comparable levels of NP-binding. By contrast, AID^{+/+} control littermates behaved as wild type mice and maintained high levels of NP-binding on TI PC only (Fig. 4 D). The mBCR expressed by NP-specific TD PC generated in AID^{-/-} mice was fully functional as demonstrated by its ability to promote Blnk phosphorylation upon *in vitro* triggering by NP-dextran or NP-KLH (Fig. 4, E and F).

Finally, as another approach to document the influence of the Ig isotype on maintenance of a mBCR expression on PC, we next compared the levels of expression of surface Ig light chains and the signaling capacity of the mBCR for IgM-, IgA- and IgG-expressing polyclonal BM PC at the steady-state. As shown in Fig. 4G, four main populations could be discriminated within the polyclonal BM PC compartment, based on their cytoplasmic Ig isotype content: i) clgM⁺, ii) clgA⁺, iii) clgG1⁺ and iv) a composite clgG⁺ subset likely including clgG2b/c⁺ and clgG3⁺ PC. Ig light chains were expressed at high density on both clgM⁺ and clgA⁺ PC while their level of expression was reduced by 70 to 75 % on clgG⁺ PC. As shown in Fig. 4 I, both anti-Ig (H+L) and anti-IgM Abs promoted Blnk phosphorylation in clgM⁺ PC while clgA⁺ PC were only responsive to anti-Ig Abs (H+L). By contrast, clgG1⁺ PC failed to

respond to any of these surrogate Ag.

Taken together, these findings demonstrate that expression of a functional membrane-bound BCR by immunization-induced BM PC is not dictated by the chemical structure of the Ag but is linked with expression of the IgM isotype. They also suggest that maintenance of a functional mBCR could be shared by IgM and IgA-expressing PC, in agreement with the observation of Pinto et al in human PC (Pinto et al., 2013). Finally, they indicate that isotype switching to IgG is incompatible with expression of a mBCR by PC. Interestingly, IgG (and IgE) isotypes differ from other Ig heavy chains by the presence of a long cytoplasmic tail (28 AA) containing an Ig tail tyrosine (ITT) signaling motif (Engels et al., 2009). It is now well documented that IgG and IgM-containing BCRs activate different sets of genes (Horikawa et al., 2007). It would thus be interesting to explore the possibility that IgG BCRs activate a genetic program that will ultimately cause the loss of the membrane-bound BCR on PC.

IgM⁺ bone marrow plasma cells acquire the competence to produce cytokines upon antigenic challenge *in vivo*. To determine whether IgM⁺ BM PC can be activated by Ag *in vivo*, we first monitored induction of the early activation marker CD69 upon antigenic challenge. As shown in Fig. 5 A, CD69 was expressed by most NP-specific TI PC after Ag exposure *in vivo* but not by unstimulated PC. No significant induction of CD69 was found on NP-specific TD PC in both the control and Ag-challenged groups. Assessment of CD69 expression on TD PC at early (6 hours) and later (24 and 36 hours) time points after boost established that their lack of Ag-induced CD69 upregulation is not due to a precipitated or delayed activation process in these cells (data not shown). We next investigated the impact of *in vivo* Ag stimulation on the gene expression profile of IgM⁺ BM PC using Affimetrix GeneChip cDNA microarrays. As illustrated by Fig. 5 B, the first two principal components separated unstimulated (control) PC from Ag-stimulated PC (boost) and clearly restituted our experimental design. This result, confirmed by the dendrogram illustrating the 1000 most significantly modulated genes upon Ag boost (Fig. S2 A) demonstrates that antigenic stimulation profoundly modifies the gene expression profile of IgM⁺ BM PC. As shown in Table S1, the biological processes related to cytokine production and regulation of cytokine production are amongst the four most affected gene sets in the Ag-stimulated PC group. These two Gene Ontology terms are also those that are the most strongly associated with the 20 most significantly differentially expressed genes in the stimulated PC group (Fig. S2 B). The list of the 13 most significantly modulated genes belonging to these two GO terms highlights two candidate cytokines: CCL5/RANTES and IL-10 (Fig. 5 C). CCL5 is a chemokine that targets multiple cell types among which eosinophils (Appay and Rowland-Jones, 2001) that constitute one of the key hematopoietic components of the PC survival

niche in the BM (Van Trung Chu et al., 2011). As shown in Fig. 5 D, the CCL5 protein was significantly induced in NP-binding PC but not in non NP-binding PC nor in non PC BM populations following NP-dextran boost. Reinforced CCL5 production could be envisaged as a means for PC to strengthen their supportive microenvironment in order to compensate for the cellular stress possibly imposed by antigenic stimulation. As illustrated by Fig. 5 D, while the IL-10 transcript was undetectable in unstimulated NP-specific PC, it was significantly induced in these cells 14 hours after *in vivo* Ag stimulation. Altogether these findings suggest that, upon Ag recognition, IgM⁺ PC initiate a biological response biased towards cytokine production characterized in particular by up-regulation of CCL5 and IL-10.

In summary, we demonstrate here that IgM-expressing mature BM PC constitute a unique effector cell population that share with B cells the capacity to sense Ag. We establish that this singular PC compartment is poised towards cytokine production and develops competence for CCL5 and IL-10 production upon Ag recognition. Interestingly, one of the most documented non-canonical (i. e. unrelated to Ig secretion) biological function of PC is their IL-10- and IL-35-mediated immunoregulatory role, as recently described by the groups of Fillatreau (Neves et al., 2010; Shen et al., 2014) and Baba (Matsumoto et al., 2014). Further experiments will be required to explore what biological role is fulfilled by cytokine-producing IgM⁺ PC in the course of secondary humoral responses.

MATERIAL AND METHODS

Mice. C57BL/6J wild type (WT) mice were purchased from Charles River Laboratories and maintained in pathogen-free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon, France). *Blimp*^{gfp} mice were generated as previously described (Kallies et al., 2004) and were crossed with WT mice to produce *Blimp*^{gfp/+} heterozygous mice used in our experiments. *Aicda*^{-/-} mice were kindly provided by T. Honjo (Muramatsu et al., 2000). Quasi-monoclonal (QM) transgenic mice were kindly provided by Dr M. Cascalho (Department of Surgery and Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA). They have been generated by the site-directed insertion of the rearranged VDJ region of the NP-specific (VH17.2.25-DSP2.3-JH4) Ig heavy-chain into the Ig heavy chain locus (Cascalho et al., 1996). The F1 resulting from the crossing of homozygous QM mice with *Blimp*^{gfp/+} or WT mice were used for Ca fluxes experiments. All strains of mice were on the C57BL/6J genetic background. They were bred under specific pathogen-free conditions in our animal facility and were used at 8-16 weeks of age. All studies and procedures were performed in accordance with EU guidelines and approved by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15).

Immunizations. For NP-dextran immunization, mice were injected subcutaneously with 200 µg NP conjugated to dextran (Biosearch Technologies) diluted in sterile and pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS) and with the TLR agonist CpG1668 (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3', MWG Operon, 80 µg per mouse) administered two days after NP-dextran vaccination. For NP-KLH immunization, mice were injected subcutaneously with 400 µg NP-KLH (Biosearch Technologies) emulsified in IFA together with CpG1668 oligonucleotides and pyrogen-free PBS. For antigenic boost of PC *in vivo*, mice were injected intravenously with 200 µg of NP-dextran or NP-KLH, diluted in 200 µL PBS.

Cell preparation and ex-vivo stimulation. Single cells suspensions from spleen were obtained by mechanical dissociation in RPMI medium (GIBCO, Life Technologies) containing 10% FCS (HyClone, ThermoFisher). BM cells were obtained by flushing tibias and femurs with the same medium. To prepare enriched BM PC populations, BM cells were stained with an APC-conjugated anti-CD138-mAb (BD Biosciences) then incubated with anti-APC MicroBeads and positively selected through isolation with LS columns exposed to a strong magnetic field (Miltenyi Biotec). Ag and surrogate Ag used for *in vitro* stimulation of B cells and PC were used at the following concentrations: i) NP-dextran and NP-KLH at 15 µg/ml, ii) goat anti-mouse IgM F(ab')₂ Abs (Jackson ImmunoResearch), goat anti-mouse-Ig (G+A+M)

F(ab')₂ Abs (Southern Biotech) and goat-anti-human lymphotactin (negative control, Abcam) at 10 µg/ml, iii) ionomycin (Sigma) at 1 µg/ml.

Flow Cytometry analysis. Before staining, Fcγ receptors were blocked for 15 minutes at 4°C with 2. 4. G2 hybridoma supernatant. Antibodies with the following specificities and conjugations were purchased from BD Biosciences: CD3ε-PE-Cy7 (145-2C11), CD19-PerCP-Cy5.5 (1D3), CD11b-PerCP-Cy5.5 (M1/70), CD45R/B220-APC-H7 (RA3-6B2), CD69-APC (H1.2F3), CD79a (F11-172)-FITC, CD138-APC and CD138-BV605 (281-2), IgM-PerCP-Cy5.5 (R6-60.2), IgG1-BV421 (A85-1), Ki67-APC (B56), Lamp-1-PE (ID4B), Ly6C-PE-Cy7 (AL-21), p-Syk-AF647 (17A/P-ZAP70), p-Blnk-AF647 (pY84), p-ERK-BV421 (20A). The FITC-conjugated anti-CD79b (HM79-12) and the APC-conjugated anti Ig λ light-chain mAbs (RML-42) were purchased from Biolegend. The AF647-conjugated anti-CCL5 mAb (2E9) was kindly provided by Dr J. Marvel (Jubin et al., 2012). The NP hapten conjugated to PE was purchased from Biosearch Technologies. The Cytofix/Cytoperm kit (BD) was used to fix and permeabilize cells for intracellular stainings. Data were collected using LSRII and LSR Fortessa flow cytometers (BD) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

For analysis of Pax5, Ig alpha and CD19 expression (Fig. 2F), PB and PC analysis were conducted on CD138-enriched cells of the spleen (at day 7 post-immunization) and BM (at day 45 post-immunization), respectively. Non-B cells were gated as CD19⁻/B220⁻ cells.

Phosfo-flow analysis. Splenocytes recovered from QM X C57Bl/6 F1 mice were used for analysis of Syk and Blnk phosphorylation in NP-specific B cells. Enriched BM PC populations prepared by positive CD138 selection from immunized *Blimp*^{gfp/+} mice were used for analysis of Syk and Blnk phosphorylation in TI or TD BM PC (Fig. 3B). Cells were stimulated *ex vivo* with Ag (NP-dextran, NP-KLH) or surrogate Ag (anti-Ig Abs) for 3 min then fixed using the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter) before staining with anti-p-Syk and anti-p-Blnk mAbs, together with NP-PE and anti-B220 and anti-CD19 mAbs (for B cell samples). NP- binding (NP⁺) and non NP-binding (NP⁻) B cells were gated as B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁺ and B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁻ cells, respectively. NP-binding and non NP-binding PC were gated as GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺ and GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁻ cells respectively. DAPI (Molecular Probes) was used to exclude dead cells.

Epifluorescence microscopy in flow for analysis of Ag internalization. Flash red-conjugated streptavidin polystyrene microspheres of 400 nM diameter (Bangs Laboratories) were coated with biotinylated NP-OVA (BioSearch). Enriched BM PC populations recovered

45 days after immunization of *Blimp^{gfp/+}* mice with NP-dextran were incubated 30 minutes with OVA-NP-coated beads at a ratio of 30 beads per cell. Cells were then fixed and stained for Lamp-1, and p-ERK using the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter) and analyzed by epifluorescence microscopy on the Amnis (ImageStream X).

Intracellular Ca⁺⁺ mobilization. Total splenocytes from QM x WT F1 mice and enriched BM PC from QM x *Blimp^{gfp/+}* F1 mice immunized 30 days before by NP-dextran were used for these experiments. Cells were stained with a PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD19 mAb (splenocytes) and NP-PE (splenocytes and enriched BM PC) prior to loading with Indo-1 acetoxymethyl (Indo-1 AM, Invitrogen). Low concentrations of NP-PE were used for staining in order to limit BCR-mediated signalling at this step. Cells were next resuspended at 6×10^6 cells/ml in 1 ml RMPI medium containing 0.2% BSA (SIGMA) and loaded with 1 μ M Indo-1 at 37°C for 45 min. After washing in PBS, cells were maintained in protein-free RPMI at 37°C. After a baseline was established, cells were stimulated with: NP-dextran, goat anti-mouse IgM F(ab')₂ Abs, goat-anti-human lymphotactin F(ab')₂ Abs (negative control) or ionomycin. Ca⁺⁺ mobilization was analyzed on the LSRII analyzer in: i) NP-binding B cells (CD19⁺/NP-PE⁺) and PC (GFP⁺/NP-PE⁺) and ii) non NP-binding B cells (CD19⁺/NP-PE⁻) and PC (GFP⁺/NP-PE⁻). Ca⁺⁺ flux was determined by measurement of the fluorescence ratio of 440/40 nm (calcium-bound Indo-1) to 530/30 nm emissions (calcium-free Indo-1), i. e. the violet to blue ratio.

BrdU incorporation and staining. Mice were given BrdU in the drinking water (1 mg/ml, Sigma) from day 0 to day 8 after immunization with NP-dextran (pulse period) after which BrdU was withdrawn (chase period). BrdU incorporation was determined using the BrdU Flow Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

ELISPOT assays. Cells were added at various concentrations into Multiscreen HTS plates (Millipore) previously coated with NP-BSA (to enumerate NP-specific Ab-secreting cells/ASCs) or anti-mouse kappa and lambda light chain (to enumerate IgM-, IgG- and IgA-producing ASCs). After overnight incubation, spots were revealed with alkaline-phosphatase-conjugated: anti-mouse kappa and lambda light chains (to reveal all heavy chain isotypes) or anti-mouse IgM, IgG2b, IgG2c, or IgG3 (Southern Biotechnology Associates) to reveal Abs of the corresponding subclasses. Plates were developed with BCIP/NBT substrate (Sigma). Spots were counted and analyzed with the ImmunoSpot Analyser S6 Ultra-V (CTL- Europe GmbH, Bonn, Germany).

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR. Total RNA from 50 to 500 sorted PC

was reverse-transcribed then amplified using the CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit (Ozyme) according to the manufacturer's protocol. The reaction mix was diluted 1/10 and stored at -20°C until real-time PCR analysis. Specific primer sets for the murine membrane-bound or secreted IgM, IgG2b, IgG2c and IgG3 heavy chains transcripts were designed using the Primers3 software and were purchased from Invitrogen Life Technologies. The real-time PCR was performed on an Applied Biosystems PRISM 7000 using the SYBR Green Master Mix: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) kit (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. The relative quantity of each transcript was normalized according to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The primer sequences (forward/reverse) used were as follows.

mIgM: 5'-	CCCCAGGCTTCTACTTTACCC-3'/	3'-CTTCCTCCTCAGCATTACACC-5',	slgM: 5'-
TGGA	ACTCCGGAGAGACCTA-3'/3'-	TCAGACATGATCAGGGAGACA-5',	mIgG2b: 5'-
GTG	AGACACGAGGGTCTGAA-3'/	3'-CGTCCAGCTCCCCATCCT-5',	slgG2b: 5'-
GTG	AGACACGAGGGTCTGAA-3'/3'-	ACCTGAGAGCTTTGTGGGTG-5',	mIgG2c: 5'-
CAC	GAGGGTCTGCACAATCA-3'/3'-	CGTCCAGCTCCCCATCCT-5',	slgG2c: 5'-
CAC	GAGGGTCTGCACAATCA-3'/3'-	GACCCAGGAGCATTGTGTGT-5',	mIgG3: 5'-
GGC	TCTCCATAACCACCACA-3'/3'-	CGTCCAGCTCCCCATCCT-5',	slgG3: 5'-
GGC	TCTCCATAACCACCACA-3'/3'-	TGTAAGACCCGAGGAATGGC-5',	GAPDH: 5'-
GCAT	GGCCTTCCGTGTCC-3'/3'-	TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-5'.	

Microarray analysis.

Cell sorting. *Blimp^{gfp/+}* mice were immunized subcutaneously with 200 µg NP-dextran (day 0) and CpG (day 2) as described above. They were boosted intravenously 60 days later with 200 µg NP-dextran (experimental group) or injected with PBS (control group). 12 hours later, bone marrow cells were harvested, enriched for PC by CD138 positive selection and stained with NP-PE. NP-specific PC were gated as CD138⁺/GFP⁺/NP-PE⁺ cells. 1000 to 5000 NP-specific PC were directly sorted on a FACS Aria sorter (BD) into RNeasy Protect Cell Reagent (QIAGEN).

RNA extraction. After pelleting, the RNeasy Protect buffer was replaced by RLT Plus buffer (QIAGEN) and the samples were homogenized by vortexing for 1 min. Genomic DNA contamination was removed using gDNA Eliminator spin columns (QIAGEN). After addition of ethanol, the samples were applied to RNeasy MinElute spin columns (QIAGEN) followed by several washing steps. Finally total RNA was eluted in 12 µl of nuclease-free water. Purity and integrity of the RNA was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico LabChip reagent set (Agilent).

GeneChip microarray assay. 1 to 5 ng of total RNA was reverse transcribed into double-stranded cDNA in a two-step process, introducing a SPIA tag sequence. Bead-purified cDNA

was amplified by a SPIA amplification reaction followed by an additional bead purification. 3 µg of SPIA cDNA were fragmented, terminally biotin-labeled and hybridized to an Affymetrix Mouse Genome 430 PM 16-Array Plate. An Affymetrix GeneTitan system (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) was used for hybridization, washing, staining and scanning. RNA extraction and sample processing were performed at an Affymetrix Service Provider and Core Facility: the KFB Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics (Regensburg, Germany; www.kfb-regensburg.de). Affymetrix CEL files were analyzed in R using the Bioconductor suite of packages. Raw probe signals were background-corrected using the maximum likelihood estimation of the normal-exponential mixture model and normalized using the variance stabilization normalization, followed by quantile normalization. For summarization, probe signals for each probe set of each sample were summarized into a single value using the summarization step of the Robust Multichip Average (RMA) approach. Non-informative genes were filtered using the I/NI algorithm. Linear models were applied using the limma package to compute the mean expression level for each cell type corrected for the animal sex. Statistical contrasts were then applied to compute differential expression between the different cell types. The empirical Bayes method was used to compute moderated p-values that were then corrected for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's false discovery rate (FDR) controlling procedure. CEL files analysis was performed by AltraBio (Lyon, France; www.altrabio.com).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Andrieu (SFR BioSciences, UMS3444/US8) for technical assistance for flow cytometry and cell sorting; N Aguilera and J-F Henry (PBES, SFR BioSciences) for help at the animal care facility. Pascal Blanc was supported by a grant from Région Rhône-Alpes ARC1.

REFERENCES

- Appay, V., and S.L. Rowland-Jones. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology*. 22:83-87.
- Bortnick, A., I. Chernova, W.J. Quinn, M. Mugnier, M.P. Cancro, and D. Allman. 2012. Long-Lived Bone Marrow Plasma Cells Are Induced Early in Response to T Cell-Independent or T Cell-Dependent Antigens. *The Journal of Immunology*. 188:5389-5396.
- Cascalho, M., A. Ma, S. Lee, L. Masat, and M. Wabl. 1996. A quasi-monoclonal mouse. *Science*. 272:1649-652.
- Engels, N., L.M. König, C. Heemann, J. Lutz, T. Tsubata, S. Griep, V. Schrader, and J. Wienands. 2009. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol*. 10:1018-1025.
- Foote, J.B., T.I. Mahmoud, A.M. Vale, and J.F. Kearney. 2011. Long-Term Maintenance of Polysaccharide-Specific Antibodies by IgM-Secreting Cells. *The Journal of Immunology*. 188:57-67.
- Hollenhorst, P.C., A.A. Shah, C. Hopkins, and B.J. Graves. 2007. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes & Development*. 21:1882-1894.
- Hombach, J., T. TT, L. Leclercq, H. Stappert, and M. Reth. 1990. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*. 343:760-762.
- Horcher, M., A. Souabni, and M. Busslinger. 2001. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity*. 14:779-790.
- Horikawa, K., S.W. Martin, S.L. Pogue, K. Silver, K. Peng, K. Takatsu, and C.C. Goodnow. 2007. Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 204:759-769.
- Humphrey, J.H. 1981. Tolerogenic or immunogenic activity of hapten-conjugated polysaccharides correlated with cellular localization. *Eur. J. Immunol*. 11:212-220.
- Jourdan, M., A. Caraux, J. De Vos, G. Fiol, M. Larroque, C. Cognot, C. Bret, C. Duperray, D. Hose, and B. Klein. 2009. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 114:5173-5181.
- Jubin, V., E. Ventre, Y. Leverrier, S. Djebali, K. Mayol, M. Tomkowiak, J. Mafille, M. Teixeira, D.Y.L. Teoh, B. Lina, T. Walzer, C. Arpin, and J. Marvel. 2012. T inflammatory memory CD8 T cells participate to antiviral response and generate secondary memory cells with an advantage in XCL1 production. *Immunol Res*. 52:284-293.
- Kallies, A., J. Hasbold, D.M. Tarlinton, W. Dietrich, L.M. Corcoran, P.D. Hodgkin, and S.L. Nutt. 2004. Plasma Cell Ontogeny Defined by Quantitative Changes in Blimp-1 Expression. *Journal of Experimental Medicine*. 200:967-977.
- Lin, K.I., C. Angelin-Duclos, T.C. Kuo, and K. Calame. 2002. Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 22:4771-4780.
- Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 388:133-134.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S.L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki, and Y. Baba. 2014. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 41:1040-1051.

- McManus, S., A. Ebert, G. Salvaggio, J. Medvedovic, Q. Sun, I. Tamir, M. Jaritz, H. Tagoh, and M. Busslinger. 2011. The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *The EMBO Journal*. 30:2388-2404.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553-563.
- Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A.A. Kühl, C. Loddenkemper, M. Haury, S.A. Nedospasov, S.H.E. Kaufmann, U. Steinhoff, D.P. Calado, and S. Fillatreau. 2010. Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity during Salmonella typhimurium Infection. *Immunity*. 33:777-790.
- Pinto, D., E. Montani, M. Bolli, G. Garavaglia, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and D. Jarrossay. 2013. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood*. 121:4110-4114.
- Reimold, A.M., P.D. Ponath, Y.S. Li, R.R. Hardy, C.S. David, J.L. Strominger, and L.H. Glimcher. 1996. Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J. Exp. Med.* 183:393-401.
- Shaffer, A.L., K.I. Lin, T.C. Kuo, X. Yu, E.M. Hurt, A. Rosenwald, J.M. Giltman, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, and L.M. Staudt. 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 17:51-62.
- Shapiro-Shelef, M., K.I. Lin, L.J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M.G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 19:607-620.
- Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R.A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, Van Duc Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M.D. Leech, R.C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinel, A. Grützkau, J.R. Grün, K. Horn, A.A. Kühl, T. Dörner, A. Bar-Or, S.H.E. Kaufmann, S.M. Anderton, and S. Fillatreau. 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 507:366-370.
- Slifka, M.K., R. Antia, J.K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 8:363-372.
- Taillardet, M., G. Haffar, P. Mondiere, M.-J. Asensio, H. Gheit, N. Burdin, T. Defrance, and L. Genestier. 2009. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood*. 114:4432-4440.
- Taillardet, M., G. Haffar, P. Mondiere, M.J. Asensio, T. Pléau Pison, N. Burdin, T. Defrance, and L. Genestier. 2010. Toll-Like Receptor Agonists Allow Generation of Long-Lasting Antipneumococcal Humoral Immunity in Response to a Plain Polysaccharidic Vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 202:470-479.
- Van Trung Chu, A. Fröhlich, G. Steinhauser, T. Scheel, T. Roch, S. Fillatreau, J.J. Lee, M. Löhning, and C. Berek. 2011. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 12:151-159.
- Zeng, M., Z. Hu, X. Shi, X. Li, X. Zhan, X.-D. Li, J. Wang, J.H. Choi, K.-W. Wang, T. Purrington, M. Tang, M. Fina, R.J. DeBerardinis, E.M.Y. Moresco, G. Pedersen, G.M. McInerney, G.B. Karlsson Hedestam, Z.J. Chen, and B. Beutler. 2014. MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses. *Science*. 346:1486-1492.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Bone marrow plasma cells generated by NP-dextran retain expression of the membrane-bound form of the BCR. (A) Flow cytometry analysis of the NP-binding capacity of spleen and BM PC at different time points after immunization of *Blimp*^{gfp/+} mice with NP-KLH or NP-dextran. (B) Compiled data illustrating the NP-binding capacity of TD and TI BM PC at different time points after immunization as assessed by the MFI of the NP-PE stainings. Data are expressed as means \pm SD of the MFI values obtained in three independent experiments. (C) The frequencies of polyclonal (all ASCs) and NP-specific ASCs were assessed in sorted NP⁺ and NP⁻ BM PC by ELISPOT. Data are means \pm SD values of the ASC numbers gathered in three independent experiments. (D) Density of expression of Ig lambda light chains by NP-specific BM PC. The bar charts on the right show a compilation of the MFI values for Ig lambda stainings (means \pm SD of three independent experiments). (E) Q-RT-PCR analysis of the membrane and secreted transcripts for the μ , γ 2b, γ 2c and γ 3 Ig isotypes in: i) B cells, ii) sorted NP-specific BM TI and TD PC. Results are expressed as relative quantity of mRNA after normalization to GAPDH expression. Data are means \pm SD of the values obtained in two independent experiments. *** P<0.001. n. s.: non significant. (F). Frequency of BM ASCs producing IgM, IgG2b, IgG2c and IgG3 Abs after immunization with NP-KLH or NP-dextran. Results are expressed as ASC numbers/10⁶ BM seeded cells and represent means \pm SD of triplicate determinations. Representative data from two (E and F) or three (A, B, C, D) independent experiments are shown. For experiments shown in panels C, D, E and F, PC were recovered 45 days after immunization.

Figure 2. NP-specific bone marrow plasma cells generated by NP-dextran immunization are quiescent and mature. (A) Blimp-1/GFP expression by splenic and BM NP-specific PB and PC at different time points post-immunization with NP-dextran or NP-KLH. Blimp-1 expression in splenic B cells was used as a negative control (grey-filled histogram). (B) Compilation of data illustrating the levels of Blimp-1 expression by splenic and BM NP-specific PC at the indicated time points post-immunization. Data are expressed as means \pm SD of the MFI values of the GFP staining histograms obtained in three independent experiments. (C, D) BrdU and Ki67 stainings (top and bottom contour plots respectively) conducted on NP-specific BM TI PC (C) and MO/MP progenitors (D) at day 8 and 32 post-immunization. (E) Compilation of the Ki67 and BrdU staining data for NP-specific BM PC and MO/MP progenitors. Data are expressed as means \pm SD of the percentages of Ki67⁺ or BrdU⁺ cells in the PC or MO/MP staining gates, calculated from four individual mice. (F). Flow plots of the Pax-5, CD19 and Ig α stainings conducted on: splenic B cells and NP-specific PB and PC. (G) Compilation of the MFI values extracted from the staining data

shown in F. Representative data from two (C, D, E) or three (A, B, F, G) independent experiments are shown.

Figure 3. The membrane-bound BCR expressed by NP-specific T cell-independent bone marrow plasma cells is functional. (A) Comparative expression of Ig β by splenic B cells, and NP-specific BM PC after immunization of WT mice with NP-KLH or NP-dextran. The grey-filled histogram represents the staining profile obtained with an isotype-matched control mAb. (B) Assessment of the BCR-induced phosphorylation of Syk (upper panels) and Blnk (lower panels) in NP-binding (NP⁺) and non NP-binding (NP⁻) B cells, TI and TD BM PC after *in vitro* stimulation with NP-dextran. The staining profiles of unstimulated cells are overlaid as grey-filled histograms. (C) Bar charts showing a compilation of the phosflow results after *in vitro* stimulation with NP-dextran or NP-KLH. Data are expressed as means \pm SD of delta MFI (from three separate experiments), calculated by subtracting the MFI values of the p-Syk or p-Blnk staining histograms for NP⁻ stimulated cells from those of NP⁺ stimulated cells. n. d. : not detectable. (D) Ca⁺⁺ mobilization induced by BCR ligation on B cells or TI BM PC. Ca⁺⁺ fluxes in NP⁺ and NP⁻ B cells and TI PC after *in vitro* stimulation with ionomycin, goat anti-IgM Abs, goat control Abs or NP-dextran. Graphs illustrate Indo 1 fluorescence traces versus time. The y axis shows the indo-1 violet to blue fluorescence ratio, an indicator of intracellular Ca⁺⁺ levels. (E) Enriched TI BM PC from immunized *Blimp*^{gfp/+} mice were incubated with fast red-conjugated polystyrene beads coated with NP-OVA and stained with LAMP-1 and p-Erk-specific mAbs after permeabilization. Cells were analyzed by epifluorescence microscopy in flow to visualize internalization and intracellular localization of the particulate form of NP in TI BM PC. The figure depicts representative images of PC that have (top rows) or have not (bottom rows) internalized Ag. Overlays of the fluorescent channels of Ag, LAMP-1 and p-Erk (merge) are shown. Data are representative of two independent experiments. BF: brightfield. Representative data from two (D, E) or three (A, B, C) independent experiments are shown.

Figure 4. Expression of a membrane-bound BCR on plasma cells is associated with expression of the IgM isotype. (A) Membrane IgM expression by TD and TI NP-specific splenic PB (at day 5 post-immunization) and BM PC (at day 45 post-immunization). Low and high NP-binding cells are gated in blue and red, respectively. (B) Differential susceptibility of IgM and non IgM-expressing TD BM PC to BCR stimulation. The contour plots on the left illustrate PC gating (top) and their pattern of expression of clgG1 and clgM (bottom). The flow plots on the right illustrate the patterns of Blnk phosphorylation. Red histograms depict expression of phosphorylated Blnk in stimulated cells. Profiles of unstimulated cells are overlaid as grey-filled histograms. (C) Contour plots illustrating the NP-binding capacity of TD

or TI BM PC recovered from AID^{+/+} or AID^{-/-} mice. (D) The bar charts show compiled data for the NP-binding experiments illustrated in panel C. The NP-binding capacities are expressed as means \pm SD of the MFI of the NP-PE staining histograms. *** $P < 0.001$, n. s : non significant. (E) Enriched TD and TI BM PC recovered from AID^{-/-} mice were stimulated *ex vivo* with NP-dextran (top histograms) or NP-KLH (bottom histograms) and stained with anti-p-Syk and p-Blnk mAbs. Profiles of unstimulated PC are overlaid as grey filled histograms. (F) The bar charts show compiled data from the phosphorylation experiments illustrated in panel E. Data are expressed as means \pm SD of delta MFI, calculated by subtracting the MFI values of the p-Syk and p-Blnk staining histograms for unstimulated cells from those of stimulated cells. (G) Enriched polyclonal BM PC from naïve WT mice were stained for intracytoplasmic IgM and IgA. cIgM⁺, cIgA⁺ and double-negative (cIgG⁺) PC are gated (left contour plot). IgG⁺ PC are further subdivided into cIgG1⁺ and cIgG1⁻ (other G subclasses) (right contour plots). (H) The flow plots illustrate the density of expression of kappa/lambda Ig light chains in the four PC populations gated in G. Staining obtained with the isotype-matched unrelated control mAb is depicted as a grey-filled histogram. The bar charts on the right show a compilation of the results (means \pm SD) from three separate experiments expressed as MFI of the kappa/lambda stainings. (I) Enriched polyclonal BM PC from naïve WT mice were stimulated *ex vivo* with an anti-mouse IgM F(ab')₂ Ab or with an anti-mouse Igs (all isotypes) F(ab')₂ Ab and stained with anti-IgM, IgA, IgG1 and p-Blnk mAbs. Red histograms depict expression of p-Blnk in stimulated cells. Profiles of unstimulated cells are overlaid as grey-filled histograms. Representative data from two (B, G, I, H) or three (A, C, D, E, F) independent experiments are shown. PC were recovered 45 days after immunization except where indicated.

Figure 5. Antigenic challenge *in vivo* modulates the gene expression profile of IgM⁺ bone marrow plasma cells and initiates a cytokine production program. (A) *Blimp*^{gfp/+} mice were primed s.c. with NP-dextran or NP-KLH and boosted i. v. at day 30 with NP-dextran (boost) or injected with PBS (control). NP-specific BM PC were analyzed 14 hours after secondary immunization for CD69 expression (red histograms). Staining profiles obtained with the isotype-matched unrelated control mAb are depicted as grey-filled histograms. (B) Principal component analysis (PCA) of the gene expression profiles of unstimulated (control) and Ag-stimulated (boost) NP-specific TI BM PC. The two groups of experimental samples (n=5 for each group) are projected on the first two principal components that account for 33.4 % of the variance. (C) Heatmap of the 13 most significantly differentially expressed genes associated with the GO terms: cytokine production and regulation of cytokine production. (D) *Blimp*^{gfp/+} mice were primed with NP-dextran and injected i. v. 45 days later with either NP-dextran (boost, empty histograms) or PBS (control,

filled histograms). CD138-enriched BM cells from both groups were recovered 12 hours post-secondary injection and analyzed for intracellular CCL5 expression in NP⁺ and NP⁻ PC as well as in CD138⁻/Ly6c⁺ non PC populations (staining negative control). Representative data from two (D) or three (A) independent experiments are shown.

Figure S1. FACS gating schemes. (A) Representative FACS pre-gating of BM PC for experiments displayed in Fig. 1 A. (B) Representative FACS gating for BM PC in *Blimp*^{gfp/+} mice based on GFP and CD138 expression (left contour plot) or on Ly6c and CD138 expression (middle contour plot). The right contour plot illustrates the back gating of GFP⁺/CD138^{hi} PC (in red) on the Ly6c/CD138 staining profile. The numbers in red indicate the proportion of cells in the two PC gates. (C). Representative FACS gating of BM PC (CD138⁺/Ly6c⁺) and MO/MP progenitors (Ly6c^{hi}/CD11b⁺) for the BrdU and Ki67 experiments shown in Fig. 2 C and D. (D) FACS gating of NP-binding and non NP-binding splenic B cells and BM PC for the phosflow assays. (E) FACS gating of NP-binding and non NP-binding splenic B cells and BM TI PC for analysis of Ca⁺⁺ mobilization in Fig. 3 D.

Figure S2. Gene expression profiling of NP-specific IgM⁺ bone marrow plasma cells after antigenic challenge *in vivo*. (A) Dendrogram of the 1000 most differentially expressed genes between unstimulated and Ag-stimulated NP-specific IgM⁺ BM PC. The analysis has been conducted on 5 distinct samples for each experimental group. (B) Gene ontology terms most strongly associated with the 20 genes with the highest fold change in Ag-stimulated NP-specific IgM⁺ BM PC (adjusted p values <0.05). A dark square indicates that the gene (see numbers below and legend on the right) belongs to the considered gene set (indicated on the left). The number in parentheses is the frequency with which the gene set is activated in the algorithm.

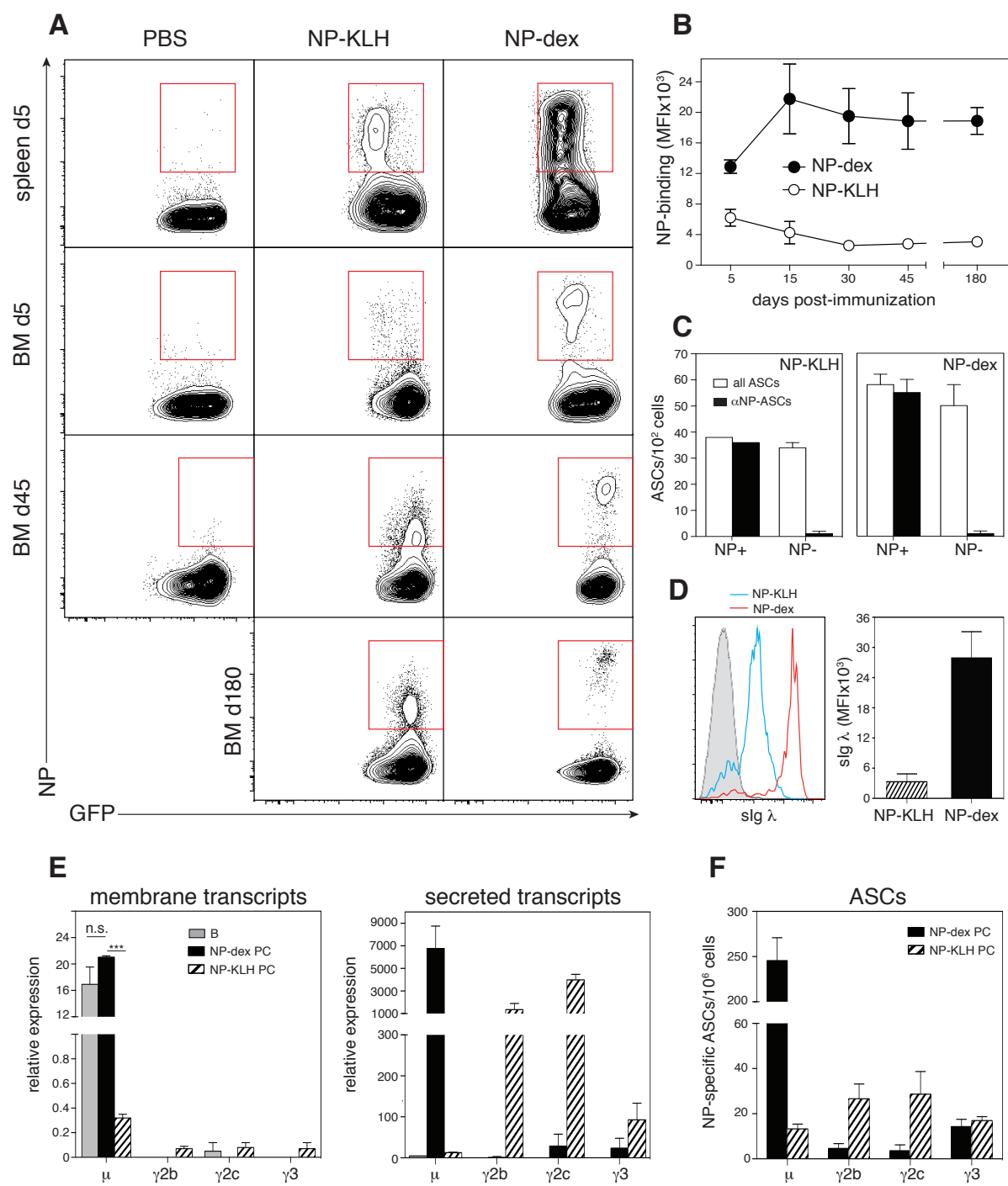


Figure 1

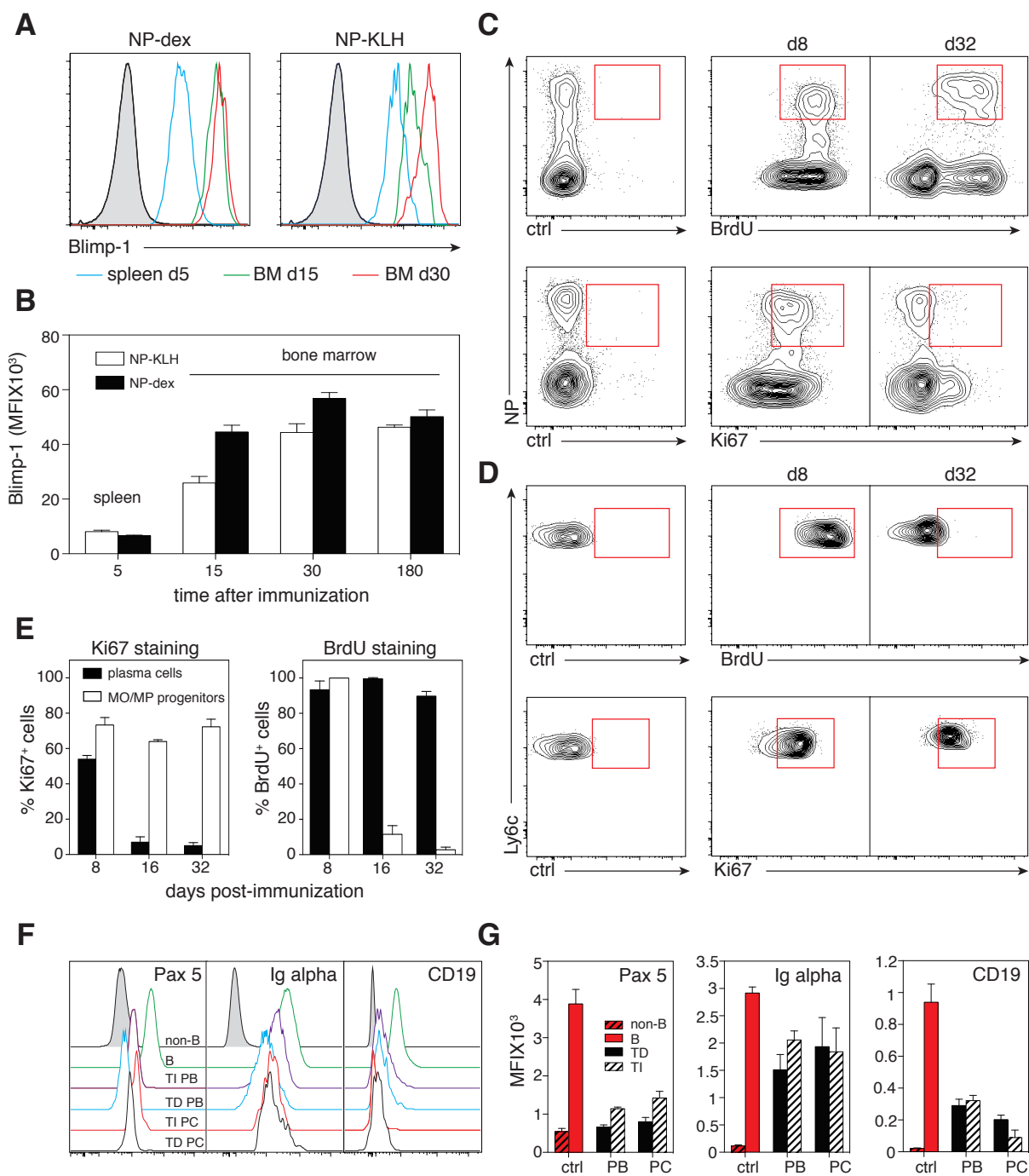


Figure 2

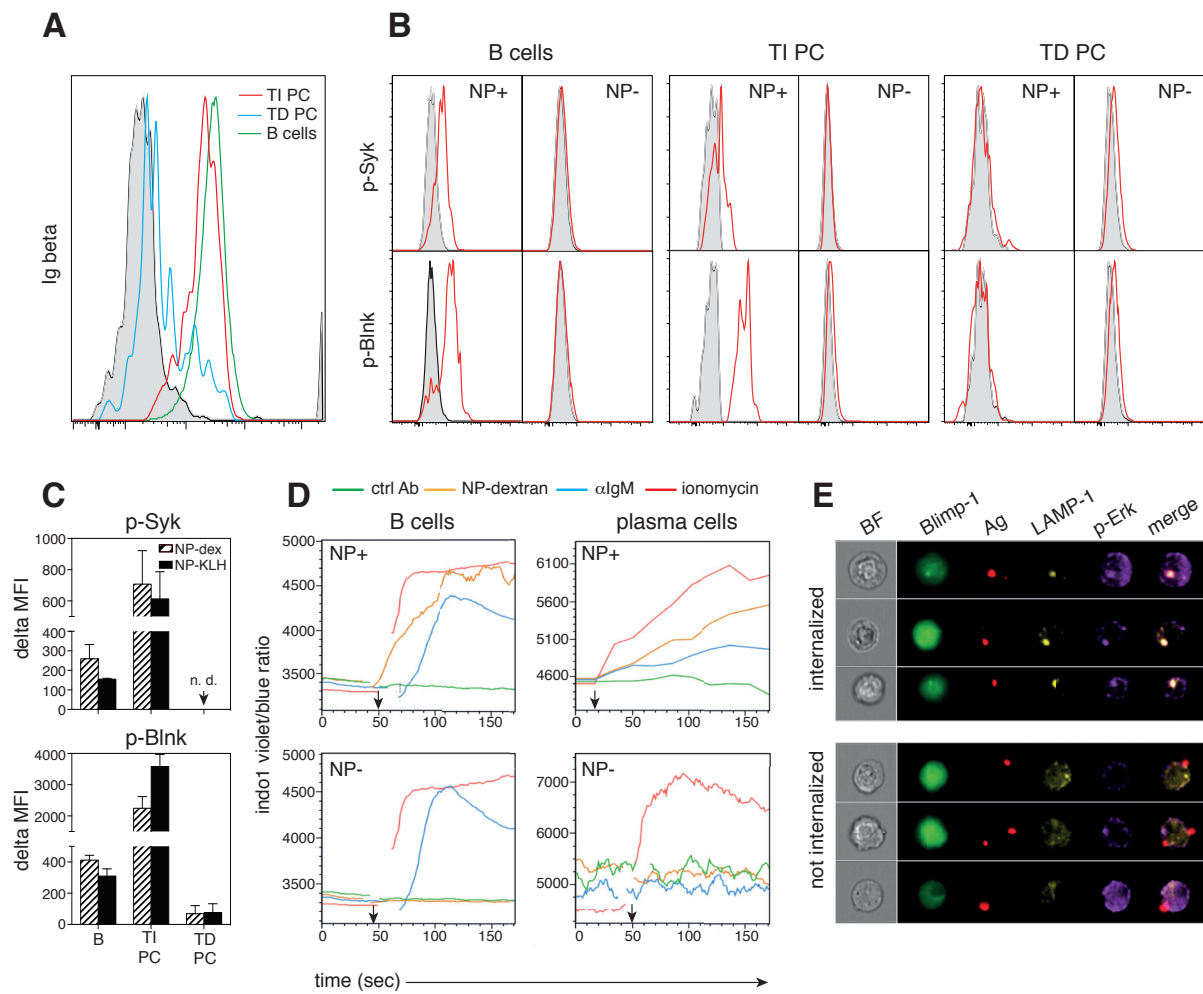


Figure 3

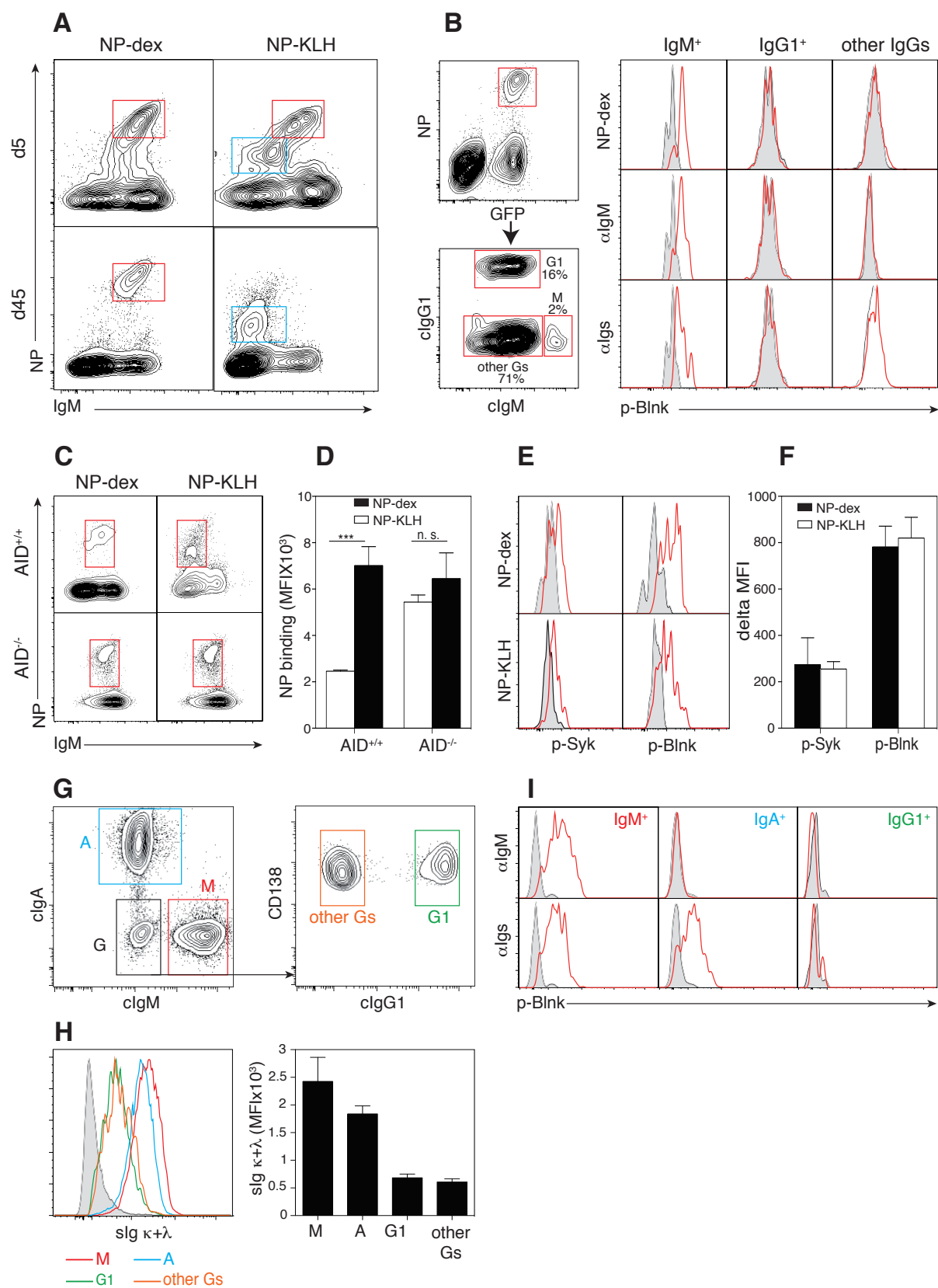


Figure 4

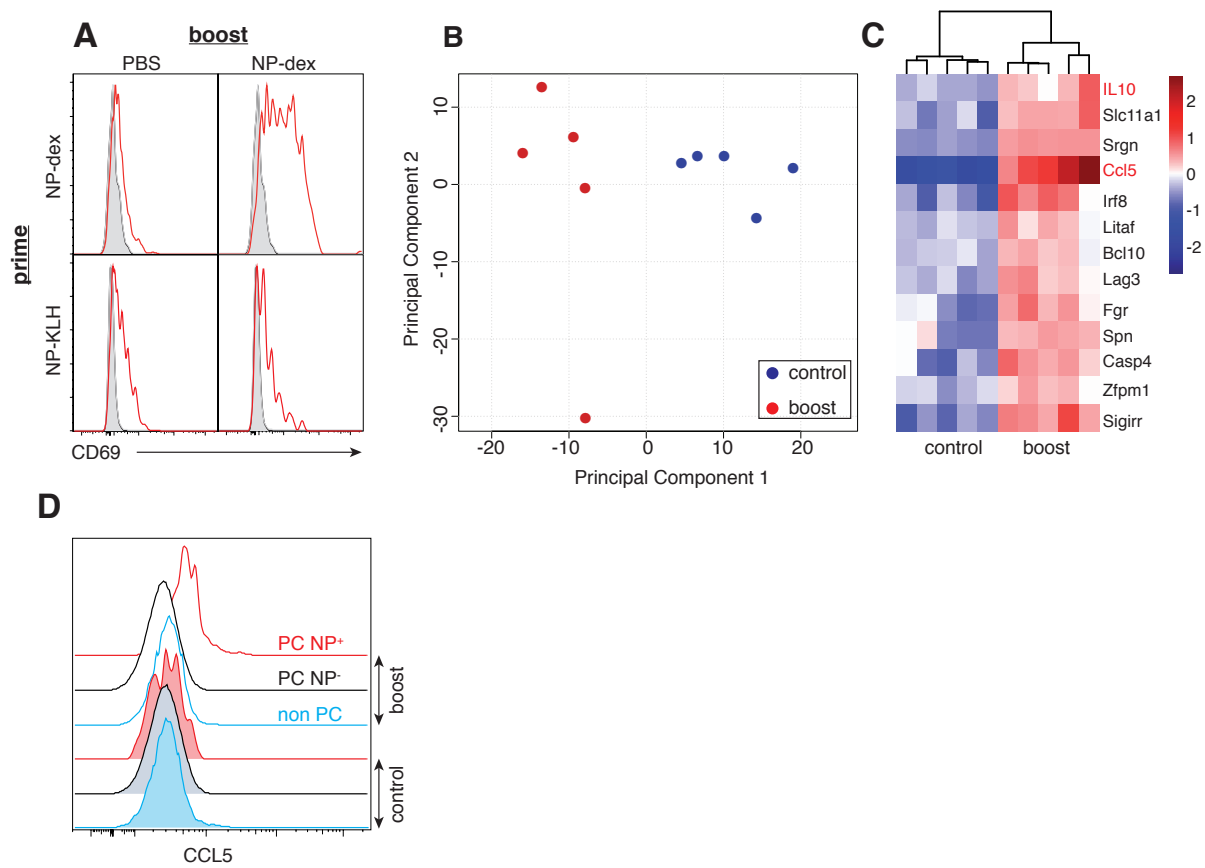


Figure 5

Table S1. Most affected gene sets in Ag-stimulated IgM⁺ bone marrow plasma cells (Gene Ontology terms).

	description	identity	p. value	FDR	Nb
1	defense response	GO:0006952	2.43 e-13	7.22 e-10	264
2	inflammatory response	GO:0006954	3.03 e-12	3.80 e-09	131
3	regulation of cytokine production	GO:0001817	3.84 e-12	3.80 e-09	170
4	cytokine production	GO:0001816	5.52 e-12	4.10 e-09	190
5	response to bacterium	GO:0009617	7.10 e-12	4.21 e-09	123
6	immune response	GO:0006955	3.11 e-11	1.54 e-08	264
7	immune system process	GO:0002376	5.06 e-11	2.14 e-08	576
8	response to other organism	GO:0051707	7.70 e-11	2.86 e-08	192
9	response to biotic stimulus	GO:0009607	1.89 e-10	6.23 e-08	200
10	cellular response to molecule of bacterial origin	GO:0071219	2.34 e-10	6.95 e-08	48
11	response to wounding	GO:0009611	3.50 e-10	9.46 e-08	208
12	regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	4.55 e-10	9.90 e-08	666
13	cellular response to biotic stimulus	GO:0071216	4.65 e-10	9.90 e-08	55
14	leukocyte activation	GO:0045321	4.67 e-10	9.90 e-08	254
15	cell activation	GO:0001775	5.00 e-10	9.90 e-08	284
16	defense response to bacterium	GO:0042742	9.67 e-10	1.77 e-07	46

Table of the 16 most affected gene sets (Gene Ontology terms) in IgM⁺ NP-specific BM PC cells isolated after 12 hours of *in vivo* stimulation with NP-dextran as compared to IgM⁺ NP-specific BM PC sorted 12 hours after PBS injection. Abbreviations : FDR, False Discovery Rate-adjusted p value (q value) ; Nb, numbers of genes in the reference set.

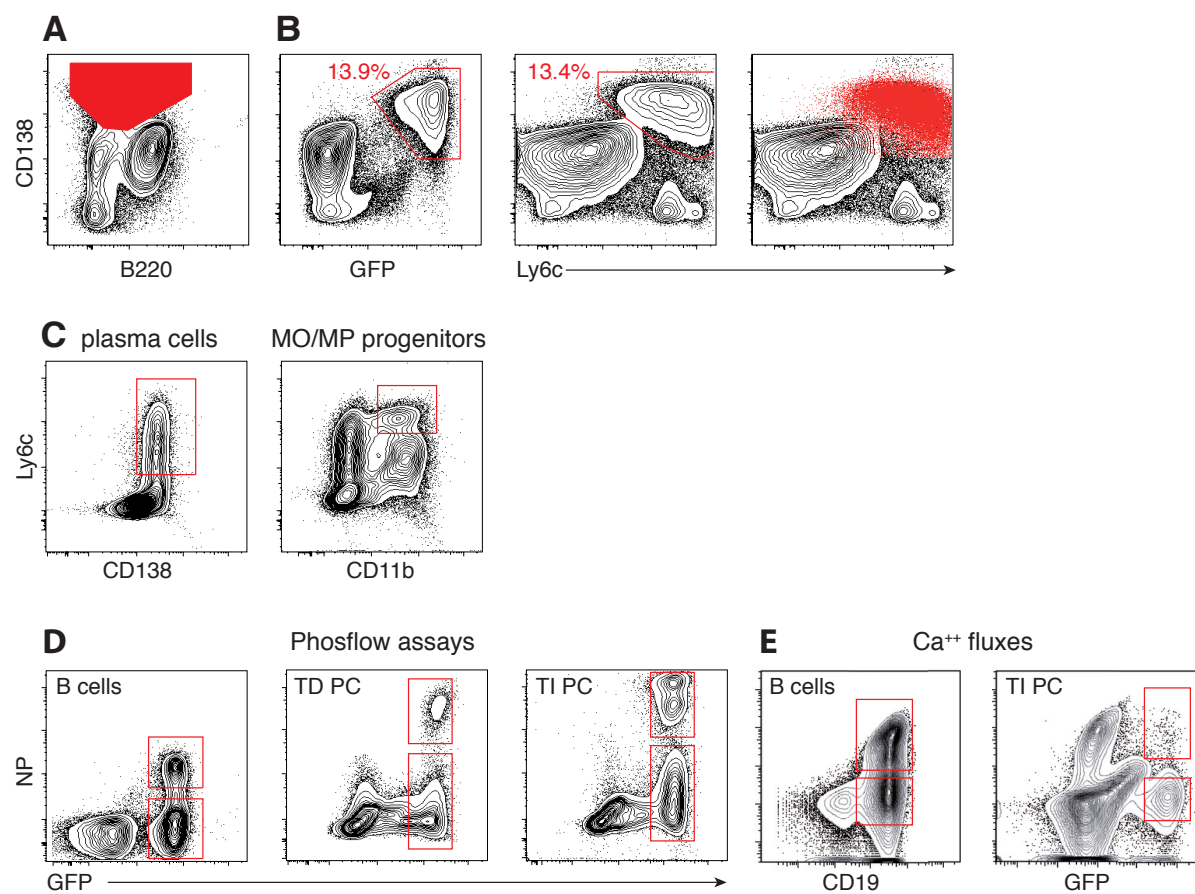


Figure S1

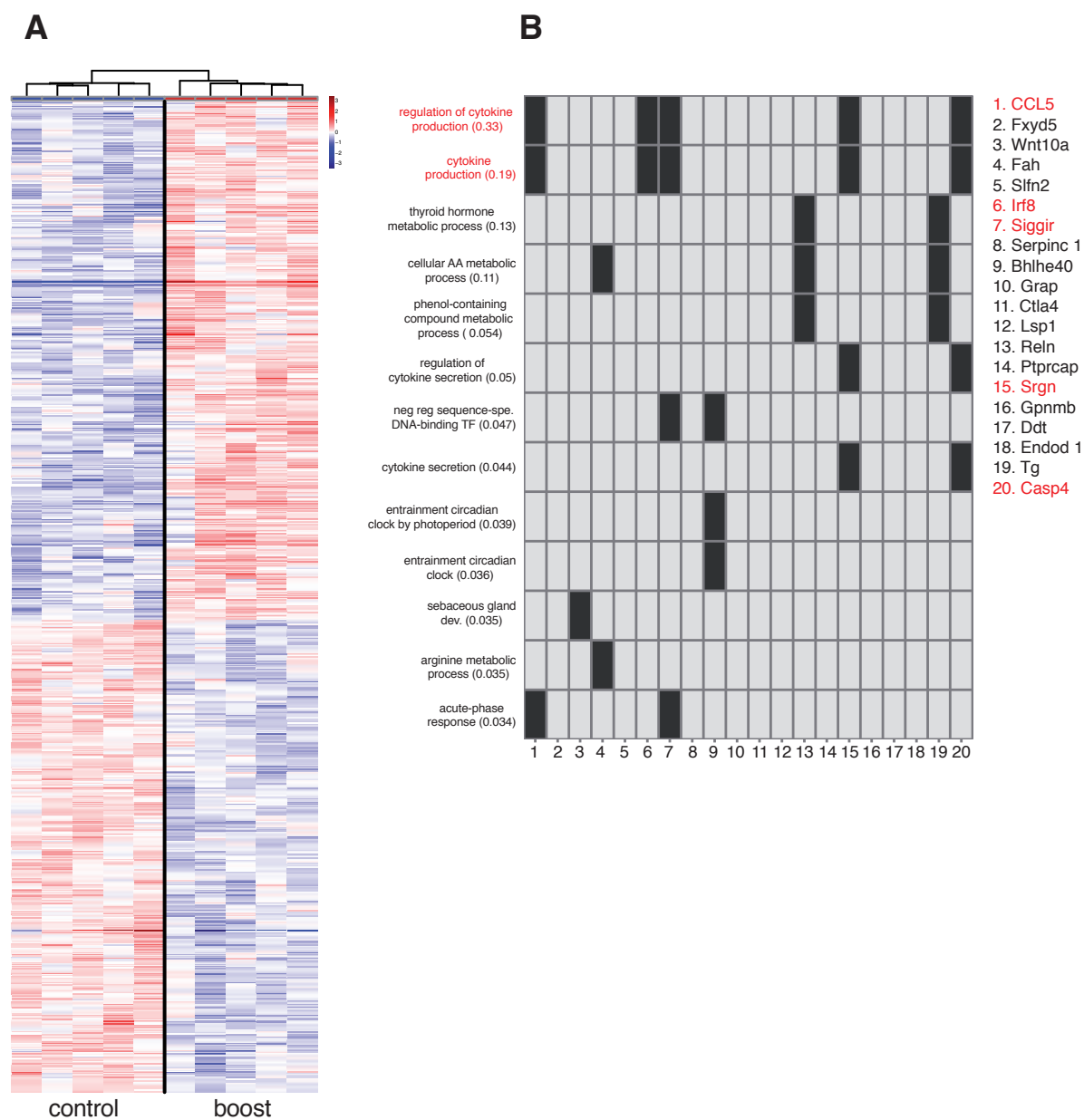


Figure S2

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abed, J., Lebreton, C., Champier, G., Cuvillier, A., Cogné, M., Meresse, B., Dugave, C., Garfa-Traoré, M., Corthésy, B., Cerf-Bensussan, N., et al. (2014). Abnormal apical-to-basal transport of dietary ovalbumin by secretory IgA stimulates a mucosal Th1 response. *Mucosal Immunology* 7, 315–324.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 2066–2078.
- Adams, D.H., Eksteen, B., and Curbishley, S.M. (2008). Immunology of the gut and liver: a love/hate relationship. *Gut* 57, 838–848.
- Adams, D.H., and Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 6, 244–251.
- Affò, S., Morales-Ibanez, O., Rodrigo-Torres, D., Altamirano, J., Blaya, D., Dapito, D.H., Millán, C., Coll, M., Caviglia, J.M., Arroyo, V., et al. (2014). CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis. *Gut* 63, 1782–1792.
- Agace, W.W., Amara, A., Roberts, A.I., Pablos, J.L., Thelen, S., Uguccioni, M., Li, X.Y., Marsal, J., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., et al. (2000). Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr. Biol.* 10, 325–328.
- Agace, W.W., and Persson, E.K. (2012). How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol* 33, 42–48.
- Aghamohammadi, A., Cheraghi, T., Gharagozlou, M., Movahedi, M., Rezaei, N., Yeganeh, M., Parvaneh, N., Abolhassani, H., Pourpak, Z., and Moin, M. (2009). IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. *J Clin Immunol* 29, 130–136.
- Altorfer, J., Hardesty, S.J., Scott, J.H., and Jones, A.L. (1987). Specific antibody synthesis and biliary secretion by the rat liver after intestinal immunization with cholera toxin. *Gastroenterology* 93, 539–549.
- Amano, K., Tsukada, K., Takeuchi, T., Fukuda, Y., and Nagura, H. (1988). IgA deposition in alcoholic liver disease. An immunoelectron microscopic study. *Am. J. Clin. Pathol.* 89, 728–734.
- Amore, A., Coppo, R., Roccatello, D., Piccoli, G., Mazzucco, G., Gomez-Chiarri, M., Lamm, M.E., and Emancipator, S.N. (1994). Experimental IgA nephropathy secondary to hepatocellular injury induced by dietary deficiencies and heavy alcohol intake. *Lab. Invest.* 70, 68–77.
- Asakura, H., Ku, G., Kataoka, M., and Flye, M.W. (2004). Regulatory cells develop after the spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Surgery* 136, 532–536.
- Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112, 286–297.
- Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 272, 14893–14898.
- Baba, S., Fujii, H., Hirose, T., Yasuchika, K., Azuma, H., Hoppe, T., Naito, M., Machimoto, T., and Ikai, I. (2004). Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 40, 255–260.

- Bach, N., Thung, S.N., and Schaffner, F. (1992). The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 15, 572–577.
- Bakema, J.E., and van Egmond, M. (2011). The human immunoglobulin A Fc receptor FcαRI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunology* 4, 612–624.
- Bala, S., Marcos, M., Kodys, K., Csak, T., Catalano, D., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2011). Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1436–1444.
- Balogopal, A., Ray, S.C., De Oca, R.M., Sutcliffe, C.G., Vivekanandan, P., Higgins, Y., Mehta, S.H., Moore, R.D., Sulkowski, M.S., Thomas, D.L., et al. (2009). Kupffer cells are depleted with HIV immunodeficiency and partially recovered with antiretroviral immune reconstitution. *Aids* 23, 2397–2404.
- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341–352.
- Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A.E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., et al. (2014). The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Science Translational Medicine* 6, 237ra66–237ra66.
- Bao, S., Beagley, K.W., Murray, A.M., Caristo, V., Matthaei, K.I., Young, I.G., and Husband, A.J. (1998). Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology* 94, 181–188.
- Barker, C.F., and Corriere, J.N. (1967). Canine renal homotransplantation with venous drainage via the portal vein. *Ann. Surg.* 165, 279–282.
- Barratt, J., Eitner, F., Feehally, J., and Floege, J. (2009). Immune complex formation in IgA nephropathy: a case of the 'right' antibodies in the 'wrong' place at the "wrong" time? *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 3620–3623.
- Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411, 489–494.
- Baumann, J., Park, C.G., and Mantis, N.J. (2010). Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunology Letters* 131, 59–66.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Behar, S.M., Dascher, C.C., Grusby, M.J., Wang, C.R., and Brenner, M.B. (1999). Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189, 1973–1980.
- Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T.L., Tougne, C., Rochat, A.-F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P.-H., and Siegrist, C.-A. (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111, 2755–2764.
- Benckert, J., Schmolka, N., Kreschel, C., Zoller, M.J., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Wardemann, H. (2011). The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *J Clin Invest* 121, 1946–1955.

Benseler, V., Warren, A., Vo, M., Holz, L.E., Tay, S.S., Le Couteur, D.G., Breen, E., Allison, A.C., van Rooijen, N., McGuffog, C., et al. (2011). Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16735–16740.

Benveniste, J., Lespinats, G., Adam, C., and Salomon, J.C. (1971a). Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J Immunol* 107, 1647–1655.

Benveniste, J., Lespinats, G., and Salomon, J. (1971b). Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *J Immunol* 107, 1656–1662.

Bergqvist, P., Gärdby, E., Stensson, A., Bemark, M., and Lycke, N.Y. (2006). Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol* 177, 7772–7783.

Bergqvist, P., Stensson, A., Lycke, N.Y., and Bemark, M. (2010). T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *The Journal of Immunology* 184, 3545–3553.

Bergtold, A., Desai, D.D., Gavhane, A., and Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503–514.

Bertola, A., Mathews, S., Ki, S.H., Wang, H., and Gao, B. (2013). Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 8, 627–637.

Bertolino, P., Heath, W.R., Hardy, C.L., Morahan, G., and Miller, J.F. (1995). Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* 25, 1932–1942.

Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 28, 221–236.

Bjorneboe, M., Prytz, H., and Orskov, F. (1972). Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1, 58–60.

Boettler, T., Spangenberg, H.C., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Urbani, S., Ferrari, C., Blum, H.E., Weizsäcker, von, F., and Thimme, R. (2005). T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 79, 7860–7867.

Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., and Desgranges, C. (1998). Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9, 277–287.

Bonder, C.S., Norman, M.U., Swain, M.G., Zbytnuik, L.D., Yamanouchi, J., Santamaria, P., Ajuebor, M., Salmi, M., Jalkanen, S., and Kubes, P. (2005). Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 23, 153–163.

Boursier, L., Gordon, J.N., Thiagamoorthy, S., Edgeworth, J.D., and Spencer, J. (2005). Human intestinal IgA response is generated in the organized gut-associated lymphoid tissue but not in the lamina propria. *Gastroenterology* 128, 1879–1889.

Bouwens, L., Remels, L., Baekeland, M., Van Bossuyt, H., and Wisse, E. (1987). Large granular lymphocytes or “pit cells” from rat liver: isolation, ultrastructural characterization and natural killer

activity. *Eur J Immunol* 17, 37–42.

Boyd, J.K., Cheung, C.K., Molyneux, K., Feehally, J., and Barratt, J. (2012). An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International* 81, 833–843.

Böttcher, J.P., Knolle, P.A., and Stabenow, D. (2011). Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis* 29, 384–390.

Brandtzaeg, P. (1999). Regionalized immune function of tonsils and adenoids. *Immunol. Today* 20, 383–384.

Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian Journal of Immunology* 70, 505–515.

Brandtzaeg, P., and Bjerke, K. (1990). Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion* 46 Suppl 2, 262–273.

Brandtzaeg, P., and Johansen, F.-E. (2005). Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 206, 32–63.

Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12, 1365–1371.

Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M. (2009). Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 50, 612–621.

Broomé, U., Olsson, R., Lööf, L., Bodemar, G., Hultcrantz, R., Danielsson, A., Prytz, H., Sandberg-Gertzén, H., Wallerstedt, S., and Lindberg, G. (1996). Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 38, 610–615.

Brown, T.A., and Mestecky, J. (1985). Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. *Infect Immun* 49, 459–462.

Brown, T.A., Russell, M.W., and Mestecky, J. (1982). Hepatobiliary transport of IgA immune complexes: molecular and cellular aspects. *J Immunol* 128, 2183–2186.

Brown, W.R., and Kloppel, T.M. (1989a). The role of the liver in translocation of IgA into the gastrointestinal tract. *Immunol Invest* 18, 269–285.

Brown, W.R., and Kloppel, T.M. (1989b). The liver and IgA: immunological, cell biological and clinical implications. *Hepatology* 9, 763–784.

Bülow, von, G.U., van Deursen, J.M., and Bram, R.J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14, 573–582.

Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., and Davies, D.A. (1969a). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472–476.

Calne, R.Y., White, H.J., Binns, R.M., Herbertson, B.M., Millard, P.R., Pena, J., Salaman, J.R., Samuel, J.R., and Davis, D.R. (1969b). Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. *Transplant. Proc.* 1, 321–324.

Cantor, H.M., and Dumont, A.E. (1967). Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 215, 744–745.

Cariello, R., Federico, A., Sapone, A., Tuccillo, C., Scialdone, V.R., Tiso, A., Miranda, A., Portincasa, P., Carbonara, V., Palasciano, G., et al. (2010). Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: Its relationship with the aetiology and the entity of liver damage. *Dig Liver Dis* 42, 200–204.

Carter, L., Barrington, P.J., and Jackson, G.D. (1989). Antibody responses in the liver and bile of rats injected with horse erythrocytes. *Immunol Cell Biol* 67 (Pt 2), 135–139.

Castigli, E., Scott, S., Dedeoglu, F., Bryce, P., Jabara, H., Bhan, A.K., Mizoguchi, E., and Geha, R.S. (2004). Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3903–3908.

Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.-P., Bram, R.J., Jabara, H., and Geha, R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201, 35–39.

Cazac, B.B., and Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13, 443–451.

Cerovic, V., Bain, C.C., Mowat, A.M., and Milling, S.W.F. (2014). Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends Immunol* 35, 270–277.

Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8, 421–434.

Cerutti, A. (2010). Immunology. IgA changes the rules of memory. *Science* 328, 1646–1647.

Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750.

Cerutti, A., Puga, I., and Cols, M. (2012). New helping friends for B cells. *Eur J Immunol* 42, 1956–1968.

Cerutti, A., Qiao, X., and He, B. (2005). Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching. *Immunol Cell Biol* 83, 554–562.

Cerutti, A., Zan, H., Kim, E.C., Shah, S., Schattner, E.J., Schaffer, A., and Casali, P. (2002). Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 169, 6594–6603.

Chandy, K.G., Hübscher, S.G., Elias, E., Berg, J., Khan, M., and Burnett, D. (1983). Dual role of the liver in regulating circulating polymeric IgA in man: studies on patients with liver disease. *Clin Exp Immunol* 52, 207–218.

Chen, Y., Ong, C.R., McKenna, G.J., Mui, A.L., Smith, R.M., and Chung, S.W. (2001). Induction of immune hyporesponsiveness after portal vein immunization with ovalbumin. *Surgery* 129, 66–75.

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y.C., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 203, 2841–2852.

Chorny, A., and Cerutti, A. (2011). A gut triumvirate rules homeostasis. *Nat Med*.

Chu, V.T., and Berek, C. (2013). The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 251, 177–188.

Chu, V.T., Beller, A., Rausch, S., Strandmark, J., Zänker, M., Arbach, O., Kruglov, A., and Berek, C. (2014). Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* 40, 582–593.

Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhauser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 12, 151–159.

Coffman, R.L., Lebman, D.A., and Shrader, B. (1989). Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170, 1039–1044.

Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R., and Elson, C.O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 19256–19261.

Cook, D.N., Prosser, D.M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N.A., Abbondanzo, S.J., Niu, X.D., Chen, S.C., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., et al. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 12, 495–503.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757–1764.

Crabbé, P.A., Nash, D.R., Bazin, H., Eyssen, H., and Heremans, J.F. (1970). Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. *Lab. Invest.* 22, 448–457.

Crago, S.S., Kutteh, W.H., Moro, I., Allansmith, M.R., Radl, J., Haaijman, J.J., and Mestecky, J. (1984). Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol* 132, 16–18.

Craig, S.W., and Cebra, J.J. (1971). Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* 134, 188–200.

Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 51–62.

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 147–163.

Crouch, E.E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montañó, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F.N., et al. (2007). Regulation of AID expression in the immune response. *J Exp Med* 204, 1145–1156.

Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623–1626.

Dahan, S., Roth-Walter, F., Arnaboldi, P., Agarwal, S., and Mayer, L. (2007). Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev* 215, 243–253.

Deal, E.M., Lahl, K., Narváez, C.F., Butcher, E.C., and Greenberg, H.B. (2013). Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest* 123, 2464–2474.

- Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 175, 671–682.
- Delacroix, D.L., Dive, C., Rambaud, J.C., and Vaerman, J.P. (1982a). IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology* 47, 383–385.
- Delacroix, D.L., Hodgson, H.J., McPherson, A., Dive, C., and Vaerman, J.P. (1982b). Selective transport of polymeric immunoglobulin A in bile. Quantitative relationships of monomeric and polymeric immunoglobulin A, immunoglobulin M, and other proteins in serum, bile, and saliva. *J Clin Invest* 70, 230–241.
- Delacroix, D.L., Malburny, G.N., and Vaerman, J.P. (1985). Hepatobiliary transport of plasma IgA in the mouse: contribution to clearance of intravascular IgA. *Eur J Immunol* 15, 893–899.
- Diana, J., Moura, I.C., Vaugier, C., Gestin, A., Tissandie, E., Beaudoin, L., Corthésy, B., Hocini, H., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2013). Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *The Journal of Immunology* 191, 2335–2343.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O., and Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3, 797–801.
- Doi, T., Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Jun, L., Ono, Y., Hayashi, A., and Hibi, T. (2012). IgA plasma cells express the negative regulatory co-stimulatory molecule programmed cell death 1 ligand and have a potential tolerogenic role in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 918–923.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Flies, D.B., van Deursen, J.M.A., and Chen, L. (2004). B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 20, 327–336.
- Dubois, B., Joubert, G., Gomez de Agüero, M., Gouanvic, M., Goubier, A., and Kaiserlian, D. (2009). Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 137, 1019–1028.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Ehrhardt, G.R.A., Hsu, J.T., Gartland, L., Leu, C.-M., Zhang, S., Davis, R.S., and Cooper, M.D. (2005). Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med* 202, 783–791.
- Eksteen, B., Grant, A.J., Miles, A., Curbishley, S.M., Lalor, P.F., Hubscher, S.G., Briskin, M., Salmon, M., and Adams, D.H. (2004). Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *J Exp Med* 200, 1511–1517.
- Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Ikuta, K., and Honjo, T. (2001). In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413, 639–643.
- Fagarasan, S., and Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 290, 89–92.
- Fagarasan, S., and Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3, 63–72.
- Fahlén-Yrild, L., Gustafsson, T., Westlund, J., Holmberg, A., Strömbeck, A., Blomquist, M.,

- MacPherson, G.G., Holmgren, J., and Yrlid, U. (2009). CD11c(high) dendritic cells are essential for activation of CD4+ T cells and generation of specific antibodies following mucosal immunization. *The Journal of Immunology* 183, 5032–5041.
- Farstad, I.N., Halstensen, T.S., Fausa, O., and Brandtzaeg, P. (1994). Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 83, 457–464.
- Feng, J.-M., Shi, J.-Q., and Liu, Y.-S. (2003). The effect of lipopolysaccharides on the expression of CD14 and TLR4 in rat Kupffer cells. *Hepatology* 37, 265–269.
- Filice, G.A. (1988). Antimicrobial properties of Kupffer cells. *Infect Immun* 56, 1430–1435.
- Fox, E.S., Thomas, P., and Broitman, S.A. (1989). Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of ³H, ¹⁴C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 96, 456–461.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 206, 3015–3029.
- Frey, A., Giannasca, K.T., Weltzin, R., Giannasca, P.J., Reggio, H., Lencer, W.I., and Neutra, M.R. (1996). Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184, 1045–1059.
- Friedman, S.L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247–2250.
- Fritz, J.H., Rojas, O.L., Simard, N., McCarthy, D.D., Hapfelmeier, S., Rubino, S., Robertson, S.J., Larijani, M., Gosselin, J., Ivanov, I.I., et al. (2012). Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481, 199–203.
- Furuya, Y., Kirimanjeswara, G.S., Roberts, S., and Metzger, D.W. (2013). Increased susceptibility of IgA-deficient mice to pulmonary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection. *Infect Immun* 81, 3434–3441.
- Gale, R.P., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1978). Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 201, 937–938.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 311–335.
- Geerts, A. (2004). On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol* 40, 331–334.
- Geissmann, F., Cameron, T.O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M.J., Dustin, M.L., and Littman, D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 3, e113.
- Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117, 933–941.
- Gorczynski, R.M., Chan, Z., Chung, S., Cohen, Z., Levy, G., Sullivan, B., and Fu, X.M. (1994).

Prolongation of rat small bowel or renal allograft survival by pretransplant transfusion and/or by varying the route of allograft venous drainage. *Transplantation* 58, 816–820.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29, 464–475.

Grant, A.J., Lalor, P.F., Hübscher, S.G., Briskin, M., and Adams, D.H. (2001). MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease). *Hepatology* 33, 1065–1072.

Green, D.R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003). Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70–81.

Griffiss, J.M., and Goroff, D.K. (1983). IgA blocks IgM and IgG-initiated immune lysis by separate molecular mechanisms. *J Immunol* 130, 2882–2885.

Guy-Grand, D., Griscelli, C., and Vassalli, P. (1974). The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 4, 435–443.

Haddad, E., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Macher, M.-A., Baudouin, V., Alberti, C., Loirat, C., Monteiro, R.C., and Peuchmaur, M. (2003). Enhanced expression of the CD71 mesangial IgA1 receptor in Berger disease and Henoch-Schönlein nephritis: association between CD71 expression and IgA deposits. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 327–337.

Hadziyannis, S., Feizi, T., Scheuer, P.J., and Sherlock, S. (1969). Immunoglobulin-containing cells in the liver. *Clin Exp Immunol* 5, 499–514.

Hahn, A., Thiessen, N., Pabst, R., Buettner, M., and Bode, U. (2010). Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology* 129, 427–436.

Hall, J., Orlans, E., Reynolds, J., Dean, C., Peppard, J., Gyure, L., and Hobbs, S. (1979). Occurrence of specific antibodies of the IgA class in the bile of rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 59, 75–84.

Hammerschmidt, S.I., Friedrichsen, M., Boelter, J., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E., Pabst, O., and Förster, R. (2011). Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut after subcutaneous immunization in mice. *J Clin Invest* 121, 3051–3061.

Hapfelmeier, S., Lawson, M.A.E., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., et al. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328, 1705–1709.

Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194, 45–56.

Harmatz, P.R., Kleinman, R.E., Bunnell, B.W., Bloch, K.J., and Walker, W.A. (1982). Hepatobiliary clearance of IgA immune complexes formed in the circulation. *Hepatology* 2, 328–333.

Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., et al. (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates

mucosal immune response. *Nature* 462, 226–230.

Hashizume, T., Momoi, F., Kurita-Ochiai, T., Kaminogawa, S., Hosono, A., Kataoka, K., Shinozaki-Kuwahara, N., Kweon, M.-N., and Yamamoto, M. (2007). Isolated lymphoid follicles are not IgA inductive sites for recombinant Salmonella. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 388–393.

Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2002). Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 169, 1277–1282.

He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussel, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol* 11, 836–845.

He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812–826.

Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., et al. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272, 5846–5853.

Hieshima, K., Kawasaki, Y., Hanamoto, H., Nakayama, T., Nagakubo, D., Kanamaru, A., and Yoshie, O. (2004). CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol* 173, 3668–3675.

Hiroi, T., Yanagita, M., Iijima, H., Iwatani, K., Yoshida, T., Takatsu, K., and Kiyono, H. (1999). Deficiency of IL-5 receptor alpha-chain selectively influences the development of the common mucosal immune system independent IgA-producing B-1 cell in mucosa-associated tissues. *J Immunol* 162, 821–828.

Hirota, K., Turner, J.-E., Villa, M., Duarte, J.H., Demengeot, J., Steinmetz, O.M., and Stockinger, B. (2013). Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat Immunol* 14, 372–379.

Honjo, T., Muramatsu, M., and Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659–668.

Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I.N. (1994). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1, 741–749.

Huang, L.-R., Wohlleber, D., Reisinger, F., Jenne, C.N., Cheng, R.-L., Abdullah, Z., Schildberg, F.A., Odenthal, M., Dienes, H.-P., Van Rooijen, N., et al. (2013). Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat Immunol* 14, 574–583.

Huard, B., McKee, T., Bosshard, C., Durual, S., Matthes, T., Myit, S., Donze, O., Frossard, C., Chizzolini, C., Favre, C., et al. (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* 118, 2887–2895.

Husby, S., Jensenius, J.C., and Svehag, S.E. (1986). Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Further characterization of the kinetics of uptake and the size distribution of the antigen. *Scandinavian Journal of Immunology* 24, 447–455.

- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K.S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P.S., Ikehara, S., et al. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180, 1849–1860.
- Inokuchi, S., Tsukamoto, H., Park, E., Liu, Z.-X., Brenner, D.A., and Seki, E. (2011). Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 1509–1518.
- Islam, K.B., Nilsson, L., Sideras, P., Hammarström, L., and Smith, C.I. (1991). TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 3, 1099–1106.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., and Honjo, T. (2003). PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198, 39–50.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191, 1381–1394.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.-Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527–538.
- Izadpanah, A., Dwinell, M.B., Eckmann, L., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (2001). Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G710–G719.
- Jackson, G.D., Lemaître-Coelho, I., Vaerman, J.P., Bazin, H., and Beckers, A. (1978). Rapid disappearance from serum of intravenously injected rat myeloma IgA and its secretion into bile. *Eur J Immunol* 8, 123–126.
- Jego, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (2001). Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 97, 1817–1822.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225–234.
- Jiang, X., Shimaoka, T., Kojo, S., Harada, M., Watarai, H., Wakao, H., Ohkohchi, N., Yonehara, S., Taniguchi, M., and Seino, K.-I. (2005). Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol* 175, 2051–2055.
- Jirillo, E., Caccavo, D., Magrone, T., Piccigallo, E., Amati, L., Lembo, A., Kalis, C., and Gumenscheimer, M. (2002). The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res.* 8, 319–327.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M.-A., Malissen, B., Marquez, G., and Agace, W. (2003). Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med* 198, 963–969.
- John, B., and Crispe, I.N. (2005). TLR-4 regulates CD8+ T cell trapping in the liver. *J Immunol* 175, 1643–1650.
- Jomantaite, I., Dikopoulos, N., Kröger, A., Leithäuser, F., Hauser, H., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (2004). Hepatic dendritic cell subsets in the mouse. *Eur J Immunol* 34, 355–365.

- Ju, C., and Pohl, L.R. (2001). Immunohistochemical detection of protein adducts of 2,4-dinitrochlorobenzene in antigen presenting cells and lymphocytes after oral administration to mice: lack of a role of Kupffer cells in oral tolerance. *Chem. Res. Toxicol.* *14*, 1209–1217.
- Kadaoui, K.A., and Corthésy, B. (2007). Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J Immunol* *179*, 7751–7757.
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Chintalacharuvu, K.R., Vaerman, J.P., and Lamm, M.E. (1991). The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 8796–8800.
- Kagnoff, M.F., and Eckmann, L. (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* *100*, 6–10.
- Kakimi, K., Guidotti, L.G., Koezuka, Y., and Chisari, F.V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* *192*, 921–930.
- Kamada, N., Davies, H.S., and Roser, B. (1981a). Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* *292*, 840–842.
- Kamada, N., Davies, H.S., and Roser, B.J. (1981b). Fully allogeneic liver grafting and the induction of donor-specific unreactivity. *Transplant. Proc.* *13*, 837–841.
- Kang, H.-S., Chin, R.K., Wang, Y., Yu, P., Wang, J., Newell, K.A., and Fu, Y.-X. (2002). Signaling via LTβR on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production. *Nat Immunol* *3*, 576–582.
- Kato, L.M., Kawamoto, S., Maruya, M., and Fagarasan, S. (2014). The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev* *260*, 67–75.
- Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L.M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Qin, H., Honda, K., Okada, T., et al. (2014). Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* *41*, 152–165.
- Khan, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., and Luster, A.D. (2006). CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* *2*, e49.
- Khanna, A., Morelli, A.E., Zhong, C., Takayama, T., Lu, L., and Thomson, A.W. (2000). Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* *164*, 1346–1354.
- Kim, M.S., and Kim, T.S. (2013). IgA+ plasma cells in murine intestinal lamina propria as a positive regulator of Treg differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M., and Honjo, T. (2001). A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 12620–12623.
- Knolle, P.A., Germann, T., Treichel, U., Uhrig, A., Schmitt, E., Hegenbarth, S., Lohse, A.W., and Gerken, G. (1999). Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* *162*, 1401–1407.

- Knolle, P.A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Löser, E., Schmitt, E., Gerken, G., and Lohse, A.W. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* 114, 427–433.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22, 226–229.
- Knolle, P.A., and Limmer, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 133, 501–506.
- Kong, Y., Wang, H., Wang, S., and Tang, N. (2014). FTY720, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, improves liver fibrosis in a mouse model by impairing the motility of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Inflammation* 37, 1326–1336.
- Kornfeld, S.J., and Plaut, A.G. (1981). Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev. Infect. Dis.* 3, 521–534.
- Kronenberg, M., and Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557–568.
- Krueger, A., Fas, S.C., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58–69.
- Krzysiek, R., Lefevre, E.A., Bernard, J., Foussat, A., Galanaud, P., Louache, F., and Richard, Y. (2000). Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in human B cells. *Blood* 96, 2338–2345.
- Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., and Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 185, 777–784.
- Kunkel, E.J., Kim, C.H., Lazarus, N.H., Vierra, M.A., Soler, D., Bowman, E.P., and Butcher, E.C. (2003). CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 111, 1001–1010.
- Kutteh, W.H., Prince, S.J., and Mestecky, J. (1982a). Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J Immunol* 128, 990–995.
- Kutteh, W.H., Prince, S.J., Phillips, J.O., Spenney, J.G., and Mestecky, J. (1982b). Properties of immunoglobulin A in serum of individuals with liver diseases and in hepatic bile. *Gastroenterology* 82, 184–193.
- la Garza, de, R.G., Sarobe, P., Merino, J., Lasarte, J.J., D'Avola, D., Belsue, V., Delgado, J.A., Silva, L., Iñarrairaegui, M., Sangro, B., et al. (2013). Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: factors predictive of tolerance. *Liver Transpl.* 19, 937–944.
- Ladjeva, I., Peterman, J.H., and Mestecky, J. (1989). IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. *Clin Exp Immunol* 78, 85–90.
- Lalor, P.F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D.H. (2002). Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 169, 983–992.

Lau, A.H., and Thomson, A.W. (2003). Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 52, 307–314.

Layseca-Espinosa, E., Korniotis, S., Montandon, R., Gras, C., Bouillie, M., Gonzalez-Amaro, R., Dy, M., and Zavala, F. (2013). CCL22-producing CD8 α - myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment. *The Journal of Immunology* 191, 2266–2272.

Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191, 1499–1512.

Lecocq, M., Detry, B., Guisset, A., and Pilette, C. (2013). Fc α RI-mediated inhibition of IL-12 production and priming by IFN- γ of human monocytes and dendritic cells. *The Journal of Immunology* 190, 2362–2371.

Lemaître-Coelho, I., Jackson, G.D., and Vaerman, J.P. (1978). Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scandinavian Journal of Immunology* 8, 459–463.

Lhotta, K. (2002). Beyond hepatorenal syndrome: glomerulonephritis in patients with liver disease. *Semin. Nephrol.* 22, 302–308.

Lian, Z.-X., Okada, T., He, X.S., Kita, H., Liu, Y.-J., Ansari, A.A., Kikuchi, K., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2003). Heterogeneity of Dendritic Cells in the Mouse Liver: Identification and Characterization of Four Distinct Populations. *J Immunol* 170, 2323–2330.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8 $^{+}$ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348–1354.

Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jüngerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., et al. (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 35, 2970–2981.

Lin, Y., Yu, L.-X., Yan, H.-X., Yang, W., Tang, L., Zhang, H.-L., Liu, Q., Zou, S.-S., He, Y.-Q., Wang, C., et al. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide promotes T-cell-mediated hepatitis in mice through Toll-like receptor 4. *Cancer Prevention Research* 5, 1090–1102.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822–829.

Liu, Z.X., Govindarajan, S., Okamoto, S., and Dennert, G. (2000). NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J Immunol* 164, 6480–6486.

Liu, Z.X., Govindarajan, S., Okamoto, S., and Dennert, G. (2001). Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *J Immunol* 166, 3035–3041.

Lorenz, R.G., and Newberry, R.D. (2004). Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 44–57.

Lu, L., Bonham, C.A., Liang, X., Chen, Z., Li, W., Wang, L., Watkins, S.C., Nalesnik, M.A., Schlissel, M.S., Demestris, A.J., et al. (2001a). Liver-derived DEC205+B220+CD19 $^{-}$ dendritic cells regulate T cell responses. *J Immunol* 166, 7042–7052.

- Lu, L., Liang, X., Li, W., Chen, Z., Nalesnick, M., Bonham, C., Fung, J., and Qian, S. (2001b). A novel subset of dendritic cells propagated from the liver promotes differentiation of T regulatory cells and enhances allograft survival. *Transplant. Proc.* 33, 229.
- Lue, C., Tarkowski, A., and Mestecky, J. (1988). Systemic immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine induces a predominant IgA2 response of peripheral blood lymphocytes and increases of both serum and secretory anti-pneumococcal antibodies. *J Immunol* 140, 3793–3800.
- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E., and Groom, A.C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am. J. Physiol.* 269, G692–G698.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222–2226.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.-E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* 1, 11–22.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665.
- Magri, G., Miyajima, M., Bascones, S., Mortha, A., Puga, I., Cassis, L., Barra, C.M., Comerma, L., Chudnovskiy, A., Gentile, M., et al. (2014). Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol* 15, 354–364.
- Manning, R.J., Walker, P.G., Carter, L., Barrington, P.J., and Jackson, G.D. (1984). Studies on the origins of biliary immunoglobulins in rats. *Gastroenterology* 87, 173–179.
- Mantis, N.J., Frey, A., and Neutra, M.R. (2000). Accessibility of glycolipid and oligosaccharide epitopes on rabbit villus and follicle-associated epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G915–G923.
- Mantis, N.J., Rol, N., and Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology* 4, 603–611.
- Mantis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacharuvu, K.R., Rey, J., Corthésy, B., and Neutra, M.R. (2002). Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* 169, 1844–1851.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2000). B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory.” *Immunol Rev* 175, 70–79.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 183, 1865–1878.
- Matsuno, K., Kudo, S., Ezaki, T., and Miyakawa, K. (1995). Isolation of dendritic cells in the rat liver lymph. *Transplantation* 60, 765–768.

- Mayrhofer, G., and Fisher, R. (1979). IgA-containing plasma cells in the lamina propria of the gut: failure of a thoracic duct fistula to deplete the numbers in rat small intestine. *Eur J Immunol* 9, 85–91.
- Mazariegos, G.V., Reyes, J., Marino, I.R., Demetris, A.J., Flynn, B., Irish, W., McMichael, J., Fung, J.J., and Starzl, T.E. (1997). Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation* 63, 243–249.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. *Immunity* 40, 248–261.
- McIntyre, K.W., and Welsh, R.M. (1986). Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J Exp Med* 164, 1667–1681.
- McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J.M., and Lamm, M.E. (1977). Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med* 145, 866–875.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Salcedo, I., García-Poley, A., and Brieva, J.A. (2003). Isolation, maturational level, and functional capacity of human colon lamina propria plasma cells. *Gut* 52, 383–389.
- Medvedev, A.E., Lentschat, A., Wahl, L.M., Golenbock, D.T., and Vogel, S.N. (2002). Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* 169, 5209–5216.
- Mehal, W.Z., and Crispe, I.N. (1998). TCR ligation on CD8⁺ T cells creates double-negative cells in vivo. *J Immunol* 161, 1686–1693.
- Mesin, L., Di Niro, R., Thompson, K.M., Lundin, K.E.A., and Sollid, L.M. (2011). Long-lived plasma cells from human small intestine biopsies secrete immunoglobulins for many weeks in vitro. *The Journal of Immunology* 187, 2867–2874.
- Mestecky, J., and Russell, M.W. (1986). IgA subclasses. *Monogr Allergy* 19, 277–301.
- Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Tomana, M., Epps, J.M., Thorpe, S.R., Phillips, J.O., and Kulhavy, R. (1989). The role of the liver in catabolism of mouse and human IgA. *Immunol Invest* 18, 313–324.
- Miller, I., Hatzivassiliou, G., Cattoretti, G., Mendelsohn, C., and Dalla-Favera, R. (2002). IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. *Blood* 99, 2662–2669.
- Milpied, P.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2013). High-affinity IgA needs TH17 cell functional plasticity. *Nat Immunol* 14, 313–315.
- Mimura, Y., Sakisaka, S., Harada, M., Sata, M., and Tanikawa, K. (1995). Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* 109, 1969–1976.
- Mito, N., Kaburagi, T., Yoshino, H., Imai, A., and Sato, K. (2006). Oral-tolerance induction in diet-induced obese mice. *Life Sci.* 79, 1056–1061.
- Miyake, Y., and Yamamoto, K. (2013). Role of gut microbiota in liver diseases. *Hepatology Research* 43, 139–146.

- Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995). T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7, 349–354.
- Monteiro, R.C., and Van De Winkel, J.G.J. (2003). IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 177–204.
- Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.-Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157–1160.
- Moreau, M.C., Ducluzeau, R., Guy-Grand, D., and Muller, M.C. (1978). Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* 21, 532–539.
- Morita, H., Sugiura, K., Inaba, M., Jin, T., Ishikawa, J., Lian, Z., Adachi, Y., Sogo, S., Yamanishi, K., Taki, H., et al. (1998). A strategy for organ allografts without using immunosuppressants or irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6947–6952.
- Moura, I.C., Centelles, M.N., Arcos-Fajardo, M., Malheiros, D.M., Collawn, J.F., Cooper, M.D., and Monteiro, R.C. (2001). Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 194, 417–425.
- Murakami, J., Shimizu, Y., Kashii, Y., Kato, T., Minemura, M., Okada, K., Nambu, S., Takahara, T., Higuchi, K., Maeda, Y., et al. (1999). Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 30, 143–150.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470–18476.
- Murray, D.A., and Crispe, I.N. (2004). TNF- α controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers. *J Immunol* 173, 2402–2409.
- Nagano, H., Monden, M., Gotoh, M., Nakano, Y., Tono, T., Fukuzaki, T., Tanigawa, T., and Mori, T. (1992). Mechanisms involved in immunosuppression induced by intraportal injection of donor spleen cells in rats. *Transplant. Proc.* 24, 2900–2901.
- Nagura, H., Smith, P.D., Nakane, P.K., and Brown, W.R. (1981). IgA in human bile and liver. *J Immunol* 126, 587–595.
- Nagura, H., Tsutsumi, Y., Hasegawa, H., Watanabe, K., Nakane, P.K., and Brown, W.R. (1983). IgA plasma cells in biliary mucosa: a likely source of locally synthesized IgA in human hepatic bile. *Clin Exp Immunol* 54, 671–680.
- Ng, E.K., Panesar, N., Longo, W.E., Shapiro, M.J., Kaminski, D.L., Tolman, K.C., and Mazuski, J.E. (2003). Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. *Mediators Inflamm.* 12, 3–8.
- Ng, L.G., Ng, C.-H., Woehl, B., Sutherland, A.P.R., Huo, J., Xu, S., Mackay, F., and Lam, K.-P. (2006). BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *Eur J Immunol* 36, 1837–1846.

- Nolan, J.P. (1989). Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury--an idea whose time has come again. *Hepatology* 10, 887–891.
- Nolan, J.P., DeLissio, M.G., Camara, D.S., Feind, D.M., and Gagliardi, N.C. (1986). IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet* 1, 176–179.
- Norris, S., Collins, C., Doherty, D.G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J., and O'Farrelly, C. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28, 84–90.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806–809.
- Okazaki, Y., Tomotake, H., Tsujimoto, K., Sasaki, M., and Kato, N. (2011). Consumption of a resistant protein, sericin, elevates fecal immunoglobulin A, mucins, and cecal organic acids in rats fed a high-fat diet. *J Nutr* 141, 1975–1981.
- Orlans, E., Peppard, J.V., Payne, A.W., Fitzharris, B.M., Mullock, B.M., Hinton, R.H., and Hall, J.G. (1983). Comparative aspects of the hepatobiliary transport of IgA. *Ann N Y Acad Sci* 409, 411–427.
- Orlans, E., Peppard, J., Reynolds, J., and Hall, J. (1978). Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. *J Exp Med* 147, 588–592.
- Otto, C., Kauczok, J., Martens, N., Steger, U., Möller, I., Meyer, D., Timmermann, W., Ulrichs, K., and Gassel, H.-J. (2002). Mechanisms of tolerance induction after rat liver transplantation: intrahepatic CD4(+) T cells produce different cytokines during rejection and tolerance in response to stimulation. *J. Gastrointest. Surg.* 6, 455–463.
- Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 12, 821–832.
- Pabst, O., and Bernhardt, G. (2010). The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *Eur J Immunol* 40, 2107–2111.
- Paik, Y.-H., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., and Brenner, D.A. (2003). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 37, 1043–1055.
- Païdassi, H., Acharya, M., Zhang, A., Mukhopadhyay, S., Kwon, M., Chow, C., Stuart, L.M., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2011). Preferential expression of integrin $\alpha\beta 8$ promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. *Gastroenterology* 141, 1813–1820.
- Palm, N.W., de Zoete, M.R., Cullen, T.W., Barry, N.A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P.H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., et al. (2014). Immunoglobulin a coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158, 1000–1010.
- Pappo, J., and Owen, R.L. (1988). Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue. *Gastroenterology* 95, 1173–1177.
- Parlesak, A., Schäfer, C., Schütz, T., Bode, J.C., and Bode, C. (2000). Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 32, 742–747.
- Parlesak, A., Schäfer, C., and Bode, C. (2002). IgA against gut-derived endotoxins: does it contribute

to suppression of hepatic inflammation in alcohol-induced liver disease? *Dig Dis Sci* 47, 760–766.

Parrott, D.M. (1976). The gut as a lymphoid organ. *Clin Gastroenterol* 5, 211–228.

Pasquier, B., Lepelletier, Y., Baude, C., Hermine, O., and Monteiro, R.C. (2004). Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 76, 1134–1141.

Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol* 11, 1110–1118.

Peng, S.L. (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17, 230–236.

Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.P., Edelman, L., Sansonetti, P.J., and Corthésy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 17, 107–115.

Pillarisetty, V.G., Shah, A.B., Miller, G., Bleier, J.I., and Dematteo, R.P. (2004). Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J Immunol* 172, 1009–1017.

Pinto, D., Montani, E., Bolli, M., Garavaglia, G., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Jarrossay, D. (2013). A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 121, 4110–4114.

Pouria, S., and Barratt, J. (2008). Secondary IgA nephropathy. *Semin. Nephrol.* 28, 27–37.

Prickett, T.C., McKenzie, J.L., and Hart, D.N. (1988). Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 46, 754–761.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13, 170–180.

Qian, J., Hashimoto, T., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1985). Studies on the induction of tolerance to alloantigens. I. The abrogation of potentials for delayed-type-hypersensitivity response to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol* 134, 3656–3661.

Qian, S., Lu, L., Fu, F., Li, Y., Li, W., Starzl, T.E., Fung, J.J., and Thomson, A.W. (1997). Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 158, 4654–4661.

Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54–S62.

Rao, V.K., Burris, D.E., Gruel, S.M., Sollinger, H.W., and Burlingham, W.J. (1988). Evidence that donor spleen cells administered through the portal vein prolong the survival of cardiac allografts in rats. *Transplantation* 45, 1145–1146.

Reljic, R. (2006). In search of the elusive mouse macrophage Fc-alpha receptor. *Immunology Letters* 107, 80–81.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins

and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361–367.

Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinghuys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* 11, e1001658.

Rodríguez, A., Tjärnlund, A., Ivanji, J., Singh, M., García, I., Williams, A., Marsh, P.D., Troye-Blomberg, M., and Fernández, C. (2005). Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 23, 2565–2572.

Roos, A., Bouwman, L.H., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Stahl, G.L., and Daha, M.R. (2001). Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* 167, 2861–2868.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1890–1893.

Roux, M.E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J.M., Weisz-Carrington, P., and Lamm, M.E. (1977). Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J Exp Med* 146, 1311–1322.

Roy, M.J., and Varvayanis, M. (1987). Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. *Cell Tissue Res.* 248, 645–651.

Rubtsov, Y.P., and Rudensky, A.Y. (2007). TGFβ signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 7, 443–453.

Russell, M.W., Spotswood, M.F., Julian, B.A., Galla, J.H., and Mestecky, J. (1987). Detection of food antigen-specific IgA immune complexes in human sera. *Adv. Exp. Med. Biol.* 216A, 813–820.

Schiff, J.M., and Underdown, B.J. (1985). Low level transport of IgA to bile via the asialoglycoprotein receptor. *FEBS Lett* 182, 85–89.

Schlosser, S.F., Azzaroli, F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., and Boyer, J.L. (2000). Induction of murine hepatocyte death by membrane-bound CD95 (Fas/APO-1)-ligand: characterization of an in vitro system. *Hepatology* 32, 779–785.

Schmidt, T.H., Bannard, O., Gray, E.E., and Cyster, J.G. (2013). CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1099–1107.

Schneider, P. (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 17, 282–289.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *Journal of Experimental Medicine* 206, 3101–3114.

Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13, 1324–1332.

Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J.R., Walland, A.C., Bornstein, V.U., Chen, K., He, B., Cassis, L., Bigas, A., Cols, M., et al. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 342, 447–453.

- Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A.P., Arnaboldi, P., Maussang, D., Berin, C., Unkeless, J.C., Mayer, L., Abreu, M.T., et al. (2008). Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology* 135, 529–538.
- Shao, B., Lu, M., Katz, S.C., Varley, A.W., Hardwick, J., Rogers, T.E., Ojogun, N., Rockey, D.C., Dematteo, R.P., and Munford, R.S. (2007). A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem* 282, 13726–13735.
- Shetty, S., Bruns, T., Weston, C.J., Stamataki, Z., Oo, Y.H., Long, H.M., Reynolds, G.M., Pratt, G., Moss, P., Jalkanen, S., et al. (2012). Recruitment mechanisms of primary and malignant B cells to the human liver. *Hepatology* 56, 1521–1531.
- Shetty, S., Weston, C.J., Oo, Y.H., Westerlund, N., Stamataki, Z., Youster, J., Hubscher, S.G., Salmi, M., Jalkanen, S., Lalor, P.F., et al. (2011). Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *The Journal of Immunology* 186, 4147–4155.
- Shi, J., Fujieda, H., Kokubo, Y., and Wake, K. (1996). Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 24, 1256–1263.
- Shi, M.J., and Stavnezer, J. (1998). CBF alpha3 (AML2) is induced by TGF-beta1 to bind and activate the mouse germline Ig alpha promoter. *J Immunol* 161, 6751–6760.
- Shikh, El, M.E.M., Sayed, El, R.M., Szakal, A.K., and Tew, J.G. (2009). T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. *The Journal of Immunology* 182, 3482–3491.
- Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jang, M.H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H., and Kiyono, H. (2004). IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J Immunol* 172, 6259–6264.
- Shockett, P., and Stavnezer, J. (1991). Effect of cytokines on switching to IgA and alpha germline transcripts in the B lymphoma I.29 mu. Transforming growth factor-beta activates transcription of the unrearranged C alpha gene. *J Immunol* 147, 4374–4383.
- Singh, K., Chang, C., and Gershwin, M.E. (2014). IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 13, 163–177.
- Smith, P.D., Smythies, L.E., Mosteller-Barnum, M., Sibley, D.A., Russell, M.W., Merger, M., Sellers, M.T., Orenstein, J.M., Shimada, T., Graham, M.F., et al. (2001). Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 167, 2651–2656.
- Socken, D.J., Jeejeebhoy, K.N., Bazin, H., and Underdown, B.J. (1979). Identification of secretory component as an IgA receptor on rat hepatocytes. *J Exp Med* 150, 1538–1548.
- Socken, D.J., Simms, E.S., Nagy, B.R., Fisher, M.M., and Underdown, B.J. (1981). Secretory component-dependent hepatic transport of IgA antibody-antigen complexes. *J Immunol* 127, 316–319.
- Sohn, H.W., Krueger, P.D., Davis, R.S., and Pierce, S.K. (2011). FcRL4 acts as an adaptive to innate molecular switch dampening BCR signaling and enhancing TLR signaling. *Blood* 118, 6332–6341.

Son, G., Kremer, M., and Hines, I.N. (2010). Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract* 2010, 1–13.

Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T., and Gordon, J.I. (2004). Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 5, 569–573.

Spalding, D.M., Williamson, S.I., Koopman, W.J., and McGhee, J.R. (1984). Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J Exp Med* 160, 941–946.

Staun-Olsen, P., Bjorneboe, M., Prytz, H., Thomsen, A.C., and Orskov, F. (1983). *Escherichia coli* antibodies in alcoholic liver disease. Correlation to alcohol consumption, alcoholic hepatitis, and serum IgA. *Scand J Gastroenterol* 18, 889–896.

Stockert, R.J., Kressner, M.S., Collins, J.C., Sternlieb, I., and Morell, A.G. (1982). IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 6229–6231.

Strugnell, R.A., and Wijburg, O.L.C. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 656–667.

Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W.W., and Fagarasan, S. (2010). The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 33, 71–83.

Szabo, G. (2015). Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 148, 30–36.

Szabo, G., Bala, S., Petrasek, J., and Gattu, A. (2010). Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 28, 737–744.

Takatsuki, M., Uemoto, S., Inomata, Y., Egawa, H., Kiuchi, T., Fujita, S., Hayashi, M., Kanematsu, T., and Tanaka, K. (2001). Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 72, 449–454.

Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. (2011a). Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247–257.

Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. (2011b). Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247–257.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448, 929–933.

Tomana, M., Kulhavy, R., and Mestecky, J. (1988). Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology* 94, 762–770.

Tomura, M., Honda, T., Tanizaki, H., Otsuka, A., Egawa, G., Tokura, Y., Waldmann, H., Hori, S., Cyster, J.G., Watanabe, T., et al. (2010). Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120, 883–893.

Tomura, M., Yoshida, N., Tanaka, J., Karasawa, S., Miwa, Y., Miyawaki, A., and Kanagawa, O. (2008). Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10871–10876.

- Toyabe, S., Seki, S., Iiai, T., Takeda, K., Shirai, K., Watanabe, H., Hiraide, H., Uchiyama, M., and Abo, T. (1997). Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 159, 1537–1542.
- Tran, D.Q. (2012). TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* 4, 29–37.
- Treon, S.P., Thomas, P., and Broitman, S.A. (1993). Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells releases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor-alpha stimulatory capacity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 153–158.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488–1492.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 29, 261–271.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9, 769–776.
- van de WIEL, A., Delacroix, D.L., van Hattum, J., Schuurman, H.J., and Kater, L. (1987a). Characteristics of serum IgA and liver IgA deposits in alcoholic liver disease. *Hepatology* 7, 95–99.
- van de WIEL, A., Schuurman, H.J., and Kater, L. (1987b). Alcoholic liver disease: an IgA-associated disorder. *Scand J Gastroenterol* 22, 1025–1030.
- van de WIEL, A., van Hattum, J., Schuurman, H.J., and Kater, L. (1988). Immunoglobulin A in the diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 94, 457–462.
- van der Steen, L., Tuk, C.W., Bakema, J.E., Kooij, G., Reijerkerk, A., Vidarsson, G., Bouma, G., Kraal, G., de Vries, H.E., Beelen, R.H.J., et al. (2009). Immunoglobulin A: Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. *Gastroenterology* 137, 2018–29.e1–3.
- van der Waaij, L.A., Limburg, P.C., Mesander, G., and van der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 38, 348–354.
- van der Waaij, L.A., Mesander, G., Limburg, P.C., and van der Waaij, D. (1994). Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry* 16, 270–279.
- van Egmond, M., Damen, C.A., van Sriel, A.B., Vidarsson, G., van Garderen, E., and van de Winkel, J.G. (2001). IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22, 205–211.
- van Egmond, M., van Garderen, E., van Sriel, A.B., Damen, C.A., van Amersfoort, E.S., van Zandbergen, G., van Hattum, J., Kuiper, J., and van de Winkel, J.G. (2000). Fc(alpha)RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 6, 680–685.
- Varol, C., Zigmond, E., and Jung, S. (2010). Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol* 10, 415–426.
- Vidarsson, G., van Der Pol, W.L., van Den Elsen, J.M., Vilé, H., Jansen, M., Duijs, J., Morton, H.C., Boel, E., Daha, M.R., Corthésy, B., et al. (2001). Activity of human IgG and IgA subclasses in immune

defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Immunol* 166, 6250–6256.

Volta, U., Bonazzi, C., Bianchi, F.B., Baldoni, A.M., Zoli, M., and Pisi, E. (1987). IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis. *Ric Clin Lab* 17, 235–242.

Vuitton, D.A., Seilles, E., Claude, P., Sava, P., and Delacroix, D.L. (1985). Gall bladder: the predominant source of bile IgA in man? *Clin Exp Immunol* 62, 185–192.

Wang, R., Fu, Y., Zhao, Q., Pan, L., and Zhang, W. (2009). Human Fc α /muR and pIgR distribute differently in intestinal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 148–152.

Wardle, E.N. (1987). Kupffer cells and their function. *Liver* 7, 63–75.

Watanabe, T., Katsukura, H., Shirai, Y., Yamori, M., Nishi, T., Chiba, T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. (2003). A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c⁺ cells, which select Fas ligand⁺ Th2 cells via apoptosis. *Hepatology* 38, 403–412.

Watanabe, T., Yoshida, M., Shirai, Y., Yamori, M., Yagita, H., Itoh, T., Chiba, T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. (2002). Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol* 168, 2188–2199.

Wedemeyer, H., He, X.S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H., and Rehermann, B. (2002). Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169, 3447–3458.

Wei, S., Kryczek, I., and Zou, W. (2006). Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108, 426–431.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654.

Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Förster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6347–6352.

Wiegard, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K.-J., Schmitt, E., and Lohse, A.W. (2005). Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hepatology* 42, 193–199.

Wilson, I.D., Onstad, G., and Williams, R.C. (1969). Serum immunoglobulin concentrations in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 57, 59–67.

Wilson, T.J., Fuchs, A., and Colonna, M. (2012). Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG. *The Journal of Immunology* 188, 4741–4745.

Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26, 117–129.

Woof, J.M., and Russell, M.W. (2011). Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunology* 4, 590–597.

- Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270–282.
- Woof, J.M., and Mestecky, J. (2005). Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 206, 64–82.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519–527.
- Wright, A., Lamm, M.E., and Huang, Y.T. (2008). Excretion of human immunodeficiency virus type 1 through polarized epithelium by immunoglobulin A. *Journal of Virology* 82, 11526–11535.
- Wu, H.-Y.E.R.M. (1992). Antibody-secreting cell responses in the mouse liver. *Immunology* 443–448.
- Wyatt, R.J., and Julian, B.A. (2013). IgA nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 368, 2402–2414.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* 8, 294–303.
- Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J.L., and Pescovitz, M.D. (1994). Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J. Pediatr. Surg.* 29, 1145–1148.
- Yin, X.-D., Jia, P.-J., Pang, Y., and He, J.-H. (2012). Protective effect of FTY720 on several markers of liver injury induced by concanavalin a in mice. *Curr Ther Res Clin Exp* 73, 140–149.
- Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., Jenkins, C.D., Zhang, J., Crocker, P.R., Klavinskis, L.S., and MacPherson, G.G. (2006). Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *J Immunol* 177, 6115–6121.
- Yu, M.-C., Chen, C.-H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C.R., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2004). Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 40, 1312–1321.
- Yu, S., Nakafusa, Y., and Flye, M.W. (1994). Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery* 116, 229–34–discussion234–5.
- Zehentmeier, S., Roth, K., Cseresnyes, Z., Sercan, O., Horn, K., Niesner, R.A., Chang, H.-D., Radbruch, A., and Hauser, A.E. (2014). Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur J Immunol*.
- Zhang, H., Stolz, D.B., Chalasani, G., and Thomson, A.W. (2013). Hepatic B cells are readily activated by Toll-like receptor-4 ligation and secrete less interleukin-10 than lymphoid tissue B cells. *Clin Exp Immunol* 173, 473–479.
- Zlydaszyk, J.C., and Moon, R.J. (1976). Fate of 51Cr-labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice. *Infect Immun* 14, 100–105.
- Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat Immunol* 15, 631–637.

Contribution du foie et des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse humorale à IgA.

La réponse humorale à immunoglobulines A (IgA) constitue un des principaux mécanismes immunologiques permettant de maintenir l'homéostasie intestinale. Les IgA sont produites majoritairement dans les muqueuses par des lymphocytes B différenciés et spécialisés dans la sécrétion d'anticorps : les plasmocytes. L'initiation de la réponse IgA se déroule dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (principalement dans les plaques de Peyer), où la reconnaissance des antigènes intestinaux entraîne l'activation des lymphocytes B naïfs, la commutation isotypique vers IgA et leur différenciation en plasmablastes. Ces cellules vont ensuite rejoindre la circulation sanguine pour finalement se loger principalement dans la muqueuse intestinale et poursuivre leur différenciation en plasmocytes producteurs d'IgA.

Mon travail de thèse a consisté à étudier la contribution du foie et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans la réponse IgA intestinale. En effet, le foie, outre son rôle majeur dans de nombreux processus métaboliques, est dorénavant reconnu comme essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale, notamment en favorisant la tolérance immunitaire envers les antigènes intestinaux, par un mécanisme médié par les pDC. Par ailleurs, les pDC ont été récemment impliquées dans l'initiation de la réponse IgA *in vitro*.

L'utilisation de deux modèles murins complémentaires permettant la déplétion sélective des pDC nous a permis de démontrer que, en dépit de données publiées montrant leur capacité à engager la commutation isotypique vers IgA *in vitro*, les pDC ne sont pas nécessaires *in vivo* pour l'induction ou le maintien des réponses IgA intestinales, à la fois à l'homéostasie ou après immunisation orale.

Dans un deuxième travail, nous montrons chez l'homme et la souris que le foie abrite un contingent de plasmocytes fortement enrichi en cellules sécrétant des IgA. Chez la souris, nous montrons que ces cellules ont un taux de renouvellement rapide, possèdent des caractéristiques phénotypiques distinctes des plasmocytes de l'intestin et proviennent de lymphocytes B récemment activés dans les plaques de Peyer. Chez la souris naïve, les plasmocytes hépatiques sécrètent des IgA dirigées contre les bactéries de la flore commensale intestinale. Enfin, dans un modèle murin de consommation chronique d'alcool, nous montrons une corrélation entre une augmentation du contingent hépatique de plasmocytes à IgA, une élévation des taux d'IgA sériques et des dépôts d'IgA hépatiques, deux désordres fréquemment observés chez les patients atteints d'hépatopathies alcooliques.

Nos données indiquent donc que le foie constitue un site effecteur alternatif de la réponse IgA initiée dans l'intestin. Ceci conforte par ailleurs la notion d'axe entéro-hépatique en montrant que des cellules effectrices de la réponse humorale provenant de l'intestin peuvent se relocaliser dans le foie et pourraient participer à la clairance d'antigènes intestinaux drainés par la veine porte.

IgA – Foie – Cellules dendritiques plasmacytoïdes – plasmocytes – homéostasie intestinale – immunisation orale.

Contribution of the liver and plasmacytoid dendritic cells in IgA humoral response.

The IgA humoral response constitutes one of the main immunological mechanisms responsible for maintenance of intestinal homeostasis. IgA are mainly produced in mucosal tissues by plasma cells, which correspond to terminally differentiated B cells specialized in antibody secretion. Initiation of IgA responses essentially takes place in gut-associated lymphoid tissues (mainly in Peyer's patches), where recognition of intestinal antigens, coupled to the presence of a particular cellular and cytokine microenvironment, trigger naive B cell expansion, IgA class switch recombination and differentiation onto plasmablasts. These cells then recirculate in the body and finally home to intestinal mucosae where they further differentiate into IgA producing plasma cells.

My thesis work was aimed to study the contribution of the liver and plasmacytoid dendritic cells (pDC) in the IgA humoral response. Indeed, the liver is now considered as a lymphoid-like organ involved in maintenance of intestinal homeostasis, particularly through its role in the induction of immune tolerance to intestinal antigens, through a pDC-mediated mechanism. Furthermore, pDC was recently proposed by others to have a prominent role in the initiation of IgA response.

Using two complementary murine models allowing for pDC depletion, we demonstrated that, despite their reported capacity to trigger IgA class switching *in vitro*, pDC are dispensable *in vivo* for induction or maintenance of intestinal IgA response both at steady state or in response to oral immunization.

In a second work, we show in human and mice that the liver shelters a plasma cell contingent that is enriched for IgA-secreting cells. In mice, we demonstrate that these cells are rapidly renewed, harbor distinct phenotypic characteristics in comparison to intestinal IgA plasma cells, and originate from B cells recently switched in Peyer's patches. In naive animals, hepatic plasma cells secrete IgA reactive to intestinal commensal bacteria. Finally, in a chronic alcohol consumption model, we show a correlation between an increase in hepatic IgA plasma cell population, elevation of seric IgA and sinusoidal IgA deposits in liver, two disorders frequently observed in alcoholic liver disease patients.

Thus, our data indicate that the liver constitutes an alternative effector site of intestinal IgA response. This strengthens the gut-liver axis notion by demonstrating that effector cells of the humoral response originating from the gut can relocate in the liver where they could participate to the clearance of intestinal antigens drained through the portal vein.

IgA – Liver – Plasmacytoid dendritic cells – plasma cells – intestinal homeostasis – oral immunization.
